

Kembang gula – Bagian 1: Keras



© BSN 2008

Hak cipta dilindungi undang-undang. Dilarang menyalin atau menggandakan sebagian atau seluruh isi dokumen ini dengan cara dan dalam bentuk apapun dan dilarang mendistribusikan dokumen ini baik secara elektronik maupun tercetak tanpa izin tertulis dari BSN

BSN
Gd. Mangala Wanabakti
Blok IV, Lt. 3,4,7,10.
Telp. +6221-5747043
Fax. +6221-5747045
Email: dokinfo@bsn.go.id
www.bsn.go.id

Diterbitkan di Jakarta

Daftar isi

Daftar isi.....	i
Prakata	ii
1 Ruang lingkup	1
2 Istilah dan definisi.....	1
3 Komposisi.....	1
4 Syarat mutu	1
5 Pengambilan contoh.....	2
6 Cara uji	2
7 Syarat lulus uji	3
8 Higiene	3
9 Pengemasan	3
10 Penandaan	3
Lampiran A (normatif) Cara pengambilan contoh kembang gula keras	4
Lampiran B (normatif) Cara uji kembang gula keras	8
Bibliografi.....	43
Tabel 1 - Syarat mutu kembang gula keras.....	1
Tabel A.1 - Nilai N, n dan c untuk berat bersih sama atau kurang dari 1 kg	5
Tabel A.2 - Nilai N, n dan c untuk berat bersih lebih dari 1 kg tapi tidak lebih dari 4,5 kg.....	6
Tabel A.3 - Nilai N, n dan c untuk berat bersih lebih dari 4,5 kg.....	6
Tabel A.4 - Nilai N, n dan c untuk berat bersih sama atau kurang dari 1 kg	6
Tabel A.5 - Nilai N, n dan c untuk berat bersih lebih dari 1 kg tapi tidak lebih dari 4,5 kg.....	6
Tabel A.6 - Nilai N, n dan c untuk berat bersih lebih dari 4,5 kg.....	7
Tabel B.1 - Ekuivalen natrium tiosulfat	14
Tabel B.2 - Reaksi biokimia <i>E. coli</i> pada uji IMVIC.....	31
Tabel B.3 - APM per 1 g contoh bila menggunakan 3 tabung untuk setiap tingkat pengenceran 0,1; 0,01; dan 0,001 g contoh	32
Tabel B.4 - Reaksi biokimia dan serologi untuk <i>Salmonella</i>	39
Tabel B.5 - Reaksi biokimia dan serologi untuk non <i>Salmonella</i>	40

Prakata

Standar Nasional Indonesia (SNI) *Kembang gula keras* merupakan salah satu dari tiga SNI hasil revisi SNI 01 – 3547 – 1994, *Kembang gula*. SNI yang lainnya adalah *Kembang gula lunak* dan *Kembang gula karet*.

Tujuan dari penyusunan standar ini adalah:

- Melindungi kesehatan konsumen;
- Menjamin perdagangan pangan yang jujur dan bertanggung jawab;
- Diversifikasi produk/pengembangan produk;
- Mendukung perkembangan industri kembang gula.

Rumusan standar ini telah memperhatikan hal-hal yang tertera dalam:

1. Undang-undang RI No. 7 tahun 1996 tentang Pangan;
2. Peraturan Pemerintah No. 69 tahun 1999 tentang Label dan Iklan Pangan.

Standar ini disusun oleh Panitia Teknis 67-04 Makanan dan Minuman dan telah dibahas dalam rapat konsensus lingkup Panitia Teknis pada tanggal 31 Januari 2007 di Jakarta. Hadir dalam rapat konsensus tersebut anggota Panitia Teknis dan wakil produsen, konsumen, lembaga pengujian, Lembaga IPTEK dan instansi terkait lainnya.

Standar ini telah melalui tahapan jajak pendapat pada tanggal 28 Agustus 2007 sampai dengan 28 Oktober 2007 dan disetujui menjadi RASNI.



Kembang gula – Bagian 1: Keras

1 Ruang lingkup

Standar ini menetapkan syarat mutu, pengambilan contoh dan cara uji yang digunakan untuk kembang gula keras.

2 Istilah dan definisi

kembang gula keras

jenis makanan selingan berbentuk padat, dibuat dari gula atau campuran gula dengan pemanis lain, dengan atau tanpa penambahan bahan pangan lain dan bahan tambahan pangan (BTP) yang diijinkan, bertekstur keras, tidak menjadi lunak jika dikunyah

3 Komposisi

3.1 Bahan baku utama

Gula

3.2 Bahan tambahan pangan

Bahan tambahan pangan yang diijinkan untuk kembang gula keras sesuai dengan peraturan yang berlaku.

4 Syarat mutu

Syarat mutu kembang gula keras sesuai Tabel 1 di bawah ini.

Tabel 1 - Syarat mutu kembang gula keras

No.	Kriteria uji	Satuan	Persyaratan
1	Keadaan		
1.1	Bau	-	Normal
1.2	Rasa	-	Normal (sesuai label)
2	Kadar air	% fraksi massa	Maks. 3,5
3	Kadar abu	% fraksi massa	Maks. 2,0
4	Gula reduksi (dihitung sebagai gula inversi)	% fraksi massa	Maks. 24
5	Sakarosa	% fraksi massa	Min. 35

Tabel 1 (lanjutan)

No.	Kriteria uji	Satuan	Persyaratan
6	Cemaran logam		
6.1	Timbal (Pb)	mg/kg	Maks. 2,0
6.2	Tembaga (Cu)	mg/kg	Maks. 2,0
6.3	Timah (Sn)	mg/kg	Maks. 40
6.4	Raksa (Hg)	mg/kg	Maks. 0,03
7	Cemaran Arsen (As)	mg/kg	Maks. 1,0
8	Cemaran mikroba		
8.1	Angka lempeng total	koloni/g	Maks. 5×10^2
8.2	Bakteri <i>coliform</i>	APM/g	Maks. 20
8.3	<i>E. coli</i>	APM/g	<3
8.4	<i>Staphylococcus aureus</i>	koloni/g	Maks. 1×10^2
8.5	<i>Salmonella</i>	-	Negatif/25 g
8.6	Kapang/khamir	koloni/g	maks. 1×10^2

5 Pengambilan contoh

Cara pengambilan contoh seperti tercantum pada Lampiran A.

6 Cara uji

Cara uji untuk syarat mutu kembang gula keras seperti di bawah ini :

- 1 Persiapan contoh seperti pada Lampiran B.1
- 2 Cara uji keadaan seperti pada Lampiran B.2
 - 2.1 Cara uji bau seperti pada Lampiran B.2.1
 - 2.2 Cara uji rasa seperti pada Lampiran B.2.2
- 3 Cara uji kadar air seperti pada Lampiran B.3
 - 3.1 Cara uji kadar air dengan metode oven seperti pada Lampiran B.3.1
 - 3.2 Cara uji kadar air dengan metode Karl Fischer seperti pada Lampiran B.3.2
- 4 Cara uji kadar abu seperti pada Lampiran B.4
- 5 Cara uji gula reduksi (dihitung sebagai gula inversi) seperti pada Lampiran B.5
- 6 Cara uji sakarosa seperti pada Lampiran B.6
- 7 Cara uji cemaran logam seperti pada Lampiran B.7
 - 7.1 Cara uji tembaga (Cu) dan timbal (Pb) seperti pada Lampiran B.7.1
 - 7.2 Cara uji timah (Sn) seperti pada Lampiran B.7.2
 - 7.3 Cara uji raksa (Hg) seperti pada Lampiran B.7.3
- 8 Cara uji cemaran arsen (As) seperti pada Lampiran B.8
- 9 Cara uji cemaran mikroba seperti pada Lampiran B.9

- 9.1 Persiapan dan homogenisasi contoh seperti pada Lampiran B.9.1
- 9.2 Cara uji angka lempeng total seperti pada Lampiran B.9.2
- 9.3 Cara uji bakteri *coliform* dan *E. coli* seperti pada Lampiran B.9.3
- 9.4 Cara uji *Staphylococcus aureus* seperti pada Lampiran B.9.4
- 9.5 Cara uji *Salmonella* seperti pada Lampiran B.9.5.
- 9.6 Cara uji kapang/khamir seperti pada Lampiran B.9.6.

7 Syarat lulus uji

Kembang gula keras dinyatakan lulus uji apabila memenuhi syarat mutu sesuai Pasal 4.

8 Higiene

Cara memproduksi kembang gula keras yang higienis termasuk cara penyiapan dan penanganannya mengacu pada peraturan tentang Pedoman Cara Produksi Pangan yang Baik.

9 Pengemasan

Kembang gula keras dikemas dalam wadah yang tertutup rapat, tidak dipengaruhi atau mempengaruhi isi, aman selama penyimpanan dan pengangkutan.

10 Penandaan

Syarat penandaan sesuai dengan peraturan tentang label dan iklan pangan.

Lampiran A (normatif) Cara pengambilan contoh kembang gula keras

A.1 Prinsip

Pengambilan contoh kembang gula keras yang dikemas dengan cara melihat banyaknya unit contoh yang cacat pada AQL (*Acceptance Quality Level*) 6,5 dan contoh diambil secara acak.

A.2 Penerapan pengambilan contoh

A.2.1 Informasi yang diperlukan

Dalam menggunakan rancangan pengambilan contoh dalam Lampiran A.1 diperlukan beberapa informasi sebagai berikut:

- a) Tingkat inspeksi;
- b) Ukuran lot (N);
- c) Ukuran kemasan terkecil (berat bersih dalam kg);
- d) Ketentuan standar mengenai kualitas produk yang dikehendaki, misalnya penggolongan cacat dan jumlah cacat yang diperbolehkan dari sejumlah lot yang diperiksa.

A.2.2 Inspeksi

- a) Pemilihan tingkat inspeksi berdasarkan:
Tingkat inspeksi I, digunakan untuk pengambilan contoh normal (biasa).
Tingkat inspeksi II, digunakan untuk pengambilan contoh bila terjadi sanggahan terhadap hasil pengujian menurut tingkat inspeksi I, atau bila diperlukan hasil pengujian yang lebih menyakinkan;
- b) Tentukan ukuran lot (N), misalkan jumlah kemasan terkecil kembang gula keras;
- c) Tentukan ukuran contoh (n) yang akan diambil dari suatu lot yang diinspeksi, yang didasarkan pada ukuran lot, ukuran kemasan terkecil, dan tingkat inspeksi. Penentuan ukuran contoh dapat dilihat pada Lampiran A.1;
- d) Ambil secara acak sejumlah ukuran contoh (n) yang diperlukan dari lot;
- e) Uji produk berdasarkan standar. Identifikasi setiap kemasan atau unit contoh yang tidak memenuhi spesifikasi yang terdapat dalam persyaratan standar dan dinyatakan cacat berdasarkan penggolongan cacat yang terdapat dalam standar;
- f) Gunakan rancangan pengambilan contoh pada Lampiran A;
- g) Nyatakan bahwa lot diterima jika cacat sama atau kurang dari jumlah cacat yang diperbolehkan (c) dan lot ditolak jika cacat melebihi jumlah cacat yang diperbolehkan (c);

A.2.3 Penerapan rancangan pengambilan contoh

A.2.3.1 Tingkat inspeksi I

Misalkan lot terdiri dari 1200 karton, setiap karton berisi 12 kemasan, masing-masing kemasan berukuran 1000 g. Keputusan diambil menggunakan Tingkat Inspeksi I jika produk tersebut belum pernah diuji dan belum pernah mendapat sanggahan mengenai kualitasnya.

- a) Ukuran lot (N) : 1000 g atau 12.000 unit
- b) Ukuran kemasan : 1000 g
- c) Tingkat inspeksi : I (lihat rancangan pengambilan contoh 1, lampiran A.3.1)
- d) Ukuran contoh (n) : 13
- e) Jumlah maks. cacat yang diterima (c) : 2

Lot diterima apabila jumlah cacat yang ditemukan dari 13 contoh yang diuji sama atau kurang dari 2 dan lot ditolak apabila jumlah cacat yang ditemukan dari 13 kemasan yang diuji lebih besar dari 2.

A.2.3.2 Tingkat inspeksi II

Bila hasil pengujian pertama mendapat sanggahan (A.2.3.1) maka harus dilakukan pemeriksaan ulangan terhadap lot tersebut dengan ukuran contoh yang lebih banyak sesuai dengan tingkat inspeksi II.

- a) Ukuran lot (N) : 1.000 x 12 atau 12.000 unit
- b) Ukuran kemasan : 1000 g
- c) Tingkat inspeksi : II (lihat rancangan pengambilan contoh 2, lampiran A.3.2)
- d) Ukuran contoh (n) : 21
- e) Jumlah maks. cacat yang diterima (c) : 3

A.2.4 Catatan mengenai ukuran contoh

Tidak perlu membatasi ukuran contoh sebagai minimum untuk ukuran lot dan tingkat inspeksi yang tepat. Dalam semua kasus, contoh yang lebih besar dapat dipilih. Dalam contoh A.2.3.2 perkiraan yang lebih dipercaya mengenai mutu lot dapat dibuat dengan mengambil contoh sebanyak 29 atau 48 dan menggunakan jumlah ketentuan, yang diterima sebanyak 4 dan 6 berturut-turut.

A.3 Rancangan pengambilan contoh

A.3.1 Rancangan pengambilan contoh 1 (Tingkat inspeksi I, AQL = 6,5)

Tabel A.1 - Nilai N, n dan c untuk berat bersih sama atau kurang dari 1 kg

Ukuran lot (N)	Ukuran contoh (n)	Jumlah maks. cacat yang diterima (c)
4.800 atau kurang	6	1
4.801 – 24.000	13	2
24.001 – 48.000	21	3
48.001 – 84.000	29	4
84.001 – 144.000	48	6
144.001 – 240.000	84	9
Lebih dari 240.000	126	13

**Tabel A.2 - Nilai N, n dan c untuk berat bersih lebih dari 1 kg
tapi tidak lebih dari 4,5 kg**

Ukuran lot (N)	Ukuran contoh (n)	Jumlah maks. cacat yang diterima (c)
2.400 atau kurang	6	1
2.401 – 15.000	13	2
15.001 – 24.000	21	3
24.001 – 42.000	29	4
42.001 – 72.000	48	6
72.001 – 120.000	84	9
Lebih dari 120.000	126	13

Tabel A.3 - Nilai N, n dan c untuk berat bersih lebih dari 4,5 kg

Ukuran lot (N)	Ukuran contoh (n)	Jumlah maks. cacat yang diterima (c)
600 atau kurang	6	1
601 – 2.000	13	2
2.001 – 7.200	21	3
7.201 – 15.000	29	4
15.001 – 24.000	48	6
24.001 – 42.000	84	9
Lebih dari 42.000	126	13

A.3.2 Rancangan pengambilan contoh 2 (Tingkat inspeksi II, AQL = 6,5)

Tabel A.4 - Nilai N, n dan c untuk berat bersih sama atau kurang dari 1 kg

Ukuran lot (N)	Ukuran contoh (n)	Jumlah maks. cacat yang diterima (c)
4.800 atau kurang	13	2
4.801 – 24.000	21	3
24.001 – 48.000	29	4
48.001 – 84.000	48	6
84.001 – 144.000	84	9
144.001 – 240.000	126	13
Lebih dari 240.000	200	19

**Tabel A.5 - Nilai N, n dan c untuk berat bersih lebih dari 1 kg
tapi tidak lebih dari 4,5 kg**

Ukuran lot (N)	Ukuran contoh (n)	Jumlah maks. cacat yang diterima (c)
2.400 atau kurang	13	2
2.401 – 15.000	21	3
15.001 – 24.000	29	4
24.001 – 42.000	48	6
42.001 – 72.000	84	9
72.001 – 120.000	126	13
Lebih dari 120.000	200	19

Tabel A.6 - Nilai N, n dan c untuk berat bersih lebih dari 4,5 kg

Ukuran lot (N)	Ukuran contoh (n)	Jumlah maks. cacat yang diterima (c)
600 atau kurang	13	2
601 – 2.000	21	3
2.001 – 7.200	29	4
7.201 – 15.000	48	6
15.001 – 24.000	84	9
24.001 – 42.000	126	13
Lebih dari 42.000	200	19



Lampiran B
(normatif)
Cara uji kembang gula keras

B.1 Persiapan contoh

Pengambilan contoh untuk uji mikrobiologi dilakukan pertama, kemudian dilanjutkan dengan pengambilan contoh untuk uji organoleptik dan analisis kimia. Pengambilan contoh diupayakan dari kemasan yang sama.

B.1.1 Persiapan contoh untuk uji mikrobiologi

Buka kemasan kembang gula keras secara aseptik dan ambil contoh kembang gula keras sebanyak 400 g kemudian hancurkan dan tempatkan dalam botol contoh.

B.1.2 Persiapan contoh untuk uji organoleptik

Buka kemasan kembang gula keras dan ambil contoh kembang gula keras.

B.1.3 Persiapan contoh untuk analisis kimia

Buka kemasan kembang gula keras dan ambil contoh kembang gula keras sebanyak 500 g kemudian hancurkan dan tempatkan dalam botol contoh yang bersih dan kering.

B.2 Keadaan**B.2.1 Bau****B.2.1.1 Prinsip**

Melakukan analisis terhadap contoh uji secara organoleptik dengan menggunakan indera penciuman (hidung).

B.2.1.2 Cara kerja

- a) Ambil contoh uji sebanyak 5 buah dan letakkan diatas gelas arloji yang bersih dan kering;
- b) Cium contoh uji untuk mengetahui baunya;
- c) Lakukan pengerjaan minimal oleh 3 orang panelis atau 1 orang tenaga ahli.

B.2.1.3 Cara menyatakan hasil

- a) Jika tidak tercium bau asing maka hasil dinyatakan "normal";
- b) Jika tercium bau asing maka hasil dinyatakan "tidak normal".

B.2.2 Rasa

B.2.2.1 Prinsip

melakukan analisis terhadap contoh uji secara organoleptik dengan menggunakan indera perasa (lidah).

B.2.2.2 Cara kerja

- Ambil 1 buah contoh uji dan rasakan dengan lidah;
- Lakukan pengerjaan minimal oleh 3 orang panelis atau 1 orang tenaga ahli.

B.2.2.3 Cara menyatakan hasil

- Jika tidak terasa rasa asing maka hasil dinyatakan "normal";
- Jika terasa rasa asing maka hasil dinyatakan "tidak normal".

B.3 Kadar air

B.3.1 Metode oven

B.3.1.1 Prinsip

Bobot yang hilang selama pemanasan dalam oven pada suhu $100\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$. Bobot yang hilang atau kadar air dihitung secara gravimetri.

B.3.1.2 Peralatan

- Desikator yang berisi desikan;
- Cawan nikel, platina atau aluminium bertutup;
- Oven terkalibrasi dengan ketelitian $1\text{ }^{\circ}\text{C}$;
- Neraca analitik terkalibrasi dengan ketelitian 0,1 mg.

B.3.1.3 Cara kerja

- Panaskan cawan beserta tutupnya dalam oven pada suhu $100\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ selama lebih kurang satu jam dan dinginkan dalam desikator selama 20 menit - 30 menit kemudian timbang dengan neraca analitik (cawan dan tutupnya) (W_0);
- Masukkan 5 g contoh ke dalam cawan, tutup, dan timbang (W_1);
- Panaskan cawan yang berisi contoh tersebut dalam keadaan terbuka dengan meletakkan tutup cawan disamping cawan di dalam oven pada suhu $100\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ selama tiga jam (tiga jam setelah suhu oven $100\text{ }^{\circ}\text{C}$);
- Tutup cawan ketika masih di dalam oven, pindahkan segera ke dalam desikator dan dinginkan selama 20 menit - 30 menit kemudian timbang;
- Lakukan pemanasan kembali selama 1 jam dan ulangi kembali sampai perubahan berat antara pemanasan selama 1 jam mempunyai interval $\leq 2\text{ mg}$ (W_2);
- Lakukan pekerjaan duplo;
- Hitung kadar air dalam contoh.

B.3.1.4 Perhitungan

$$\text{Kadar air} = \frac{W_1 - W_2}{W_1 - W_0} \times 100\%$$

dengan;

W_0 adalah bobot cawan kosong dan tutupnya, (g);

W_1 adalah bobot cawan, tutupnya dan contoh sebelum dikeringkan, (g);

W_2 adalah bobot cawan, tutupnya dan contoh setelah dikeringkan, (g).

B.3.1.5 Ketelitian

Kisaran hasil dua kali ulangan maksimal 10 % dari nilai rata-rata hasil kadar air atau deviasi (RSD) maksimal 4 %. Jika kisaran lebih besar dari 10 % atau deviasi lebih besar dari 4 % analisis harus diulang kembali.

B.3.2 Metode Karl Fischer

B.3.2.1 Prinsip

Contoh dititar menggunakan pereaksi Karl Fischer yang terdiri dari iodine, sulfur dioksida, piridin dan metanol. Iodin akan direduksi oleh sulfur dioksida dengan adanya piridin dan metanol selama adanya air dalam contoh.

B.3.2.2 Peralatan

- Perangkat titrasi Karl Fischer (manual atau otomatis dengan stirer)
- Siring ukuran 1 ml dengan jarum yang ujungnya bertutup (0-40 unit jenis insulin)
- Siring ukuran 10 ml tanpa jarum dari jenis plastik *disposable*

B.3.2.3 Pereaksi

- Pereaksi Karl Fischer
 - Larutkan 133 g *Iodine* (I_2) dengan 425 ml *pyridine* kering dalam gelas botol kering yang bertutup.
 - Kemudian tambahkan 425 ml *ethylene glycol monomethyl ether* kering.
 - Dinginkan pada suhu 4 °C dalam penangas es dan busakan dengan 102 g -105 g SO_2 .
 - Campurkan hingga merata dan diamkan 12 jam. Pereaksi yang dibuat umumnya sudah stabil, tapi perlu distandarisasi setiap satu seri penetapan.
 - Masukkan 50 ml formamida dalam piala Barzelius berukuran 200 ml yang memiliki stirer magnetik.
 - Titir perlahan-lahan hingga mendekati titik akhir hingga penambahan 0,1 ml menunjukkan titik nol selama 60 detik.
 - Tambahkan dengan cepat 0,250 g - 0,350 g *dissodium tartrate*. $2H_2O$. Segera lakukan titrasi lagi sampai mencapai titik akhir. Ulangi penentuan dan hitung rata-ratanya :

$$\frac{H_2O}{\text{ml pereaksi}} (\text{mg}) = \frac{(\text{mg } Na_2C_4H_4O_6 \cdot 2H_2O \times 0,1566)}{\text{ml pereaksi}}$$

- Pelarut Karl Fischer
Campur metanol anhidrat dan $CHCl_3$ dengan volume yang sama

B.3.2.4 Standardisasi pereaksi Karl Fischer

- Timbang secara tepat 125 mg H₂O dari 1 ml siring (5 unit) ke dalam 30 ml - 50 ml pelarut yang belum dititrasi;
- Titrasi dengan menggunakan pereaksi Karl Fischer sampai mendekati titik akhir dan tambahkan 0,1 ml sampai titik akhir tidak berubah selama 1 menit (biasanya > 50 μ amp);

$$c) \text{ Hitung } C = \frac{g \text{ H}_2\text{O}}{\text{ml pereaksi}}$$

Perlakuan ulangan harus tidak melebihi 0,1 mg H₂O/ ml pereaksi.

B.3.2.5 Cara kerja

- Masukkan contoh dalam kantong *Whirl-Pak* yang tertutup kemudian masukkan dalam gelas piala 400 ml dan lelehkan dalam oven suhu 40 °C \pm 2 °C selama \leq 2 jam;
- Campurkan dengan cara mengaduk selama 1 menit menggunakan spatula atau pengaduk gelas;
- Pindahkan contoh dengan menggunakan siring berukuran 10 ml, kemudian timbang;
- Tambahkan contoh yang mengandung 100 mg H₂O ke dalam 30 ml - 50 ml pereaksi yang belum dititrasi dan ditimbang kembali. Kemudian lakukan titrasi seperti pada proses standarisasi.

B.3.2.6 Perhitungan

$$H_2O (\%) = \frac{\text{ml pereaksi} \times C \times 100}{g \text{ contoh}}$$

B.3.2.7 Ketelitian

Kisaran hasil dua kali ulangan maksimal 10 % dari nilai rata-rata hasil kadar air atau deviasi (RSD) maksimal 4 %. Jika kisaran lebih besar dari 10 % atau deviasi lebih besar dari 4 % analisis harus diulang kembali.

B.4 Kadar abu**B.4.1 Prinsip**

Bobot abu yang terbentuk selama pembakaran dalam tanur pada suhu 525 °C sampai terbentuk abu berwarna putih. Kadar abu dihitung secara gravimetri.

B.4.2 Peralatan

- Desikator yang berisi desikan;
- Cawan platina, kuarsa atau porselen yang berukuran 50 ml – 100 ml;
- Oven terkalibrasi dengan ketelitian 1 °C;
- Tanur terkalibrasi dengan ketelitian 1 °C;
- Neraca analitik terkalibrasi dengan ketelitian 0,1 mg.
- Penangas air;
- Penangas listrik.

B.4.3 Cara kerja

- Panaskan cawan dalam tanur pada suhu $525\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$ selama lebih kurang satu jam dan dinginkan dalam desikator selama 30 menit kemudian timbang dengan neraca analitik (W_0);
- Masukkan 5 g – 10 g contoh ke dalam cawan dan timbang (W_1);
- Panaskan cawan yang berisi contoh dalam oven pada suhu $105\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ sampai H_2O hilang;
- Tambahkan beberapa tetes minyak zaitun murni dan panaskan perlahan diatas api atau lampu IR sampai pengembangan berhenti;
- Tempatkan cawan yang berisi contoh tersebut dalam tanur pada suhu $525\text{ }^{\circ}\text{C}$ sampai terbentuk abu berwarna putih;
- Tambahkan air ke dalam abu, keringkan dalam penangas air kemudian dilanjutkan pada pemanas listrik kemudian diabukan kembali pada suhu $525\text{ }^{\circ}\text{C}$ sampai mencapai berat yang tetap;
- Pindahkan segera ke dalam desikator dan dinginkan selama 30 menit kemudian timbang (W_2);
- Lakukan pekerjaan duplo;
- Hitung kadar abu dalam contoh.

B.4.4 Perhitungan

$$\text{Kadar abu} = \frac{W_1 - W_2}{W_1 - W_0} \times 100\%$$

dengan;

W_0 adalah bobot cawan kosong, (g);

W_1 adalah bobot cawan dan contoh sebelum dikeringkan, (g);

W_2 adalah bobot cawan dan contoh setelah dikeringkan, (g).

B.4.5 Ketelitian

Kisaran hasil dua kali ulangan maksimal 10 % dari nilai rata-rata hasil kadar abu atau deviasi (*RSD*) maksimal 4 %. Jika kisaran lebih besar dari 10 % atau *RSD* lebih besar dari 4 %, maka analisis harus diulang kembali.

B.5 Gula reduksi (dihitung sebagai gula inversi)**B.5.1 Prinsip**

Gula reduksi seperti glukosa, fruktosa, maltosa dan laktosa akan mereduksi larutan Luff Schoorl menjadi CuO_2 . Jumlah larutan gula yang mereduksi larutan Luff Schoorl ditentukan dengan cara titrasi dengan larutan natrium tio sulfat.

B.5.2 Pereaksi

- Larutan Luff Schoorl;
Larutkan 143.8 g Na_2CO_3 an hidrat dalam kira-kira 300 ml air suling. Sambil diaduk, tambahkan 50 g asam sitat yang telah dilarutkan dengan 50 ml air suling. Tambahkan 25 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ yang telah dilarutkan dengan 100 ml air suling. Pindahkan larutan tersebut ke dalam labu ukur 1 liter tetapkan sampai tanda garis dengan air suling dan kocok. Biarkan semalam dan saring bila perlu. Larutan ini mempunyai kepekatan Cu^{2+} 0,2 N dan Na_2CO_3 2 M.

- b) Larutan kalium iodida, KI 20 %;
- c) Larutan asam sulfat, H_2SO_4 3 M dan 25 %;
- d) Larutan natrium tio sulfat, $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 0,1 N;
- e) Larutan asam klorida, HCl 0,1 M dan 25 %;
- f) Indikator kanji 0,5 %;
- g) Larutan natrium hidroksida, NaOH 0,1 M ;
- h) Larutan indikator fenolftalen;
- i) Larutan timbal asetat setengah basa;
- j) Larutan amonium hidrogen fosfat, $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 10 %.

B.5.3 Peralatan

- Neraca analitik terkalibrasi dengan ketelitian 0,1 g;
- Erlenmeyer 500 ml;
- Pipet volumetrik 10 ml dan 25 ml terkalibrasi;
- Labu ukur 100 ml, 250 ml dan 1000 ml terkalibrasi;
- Buret 50 ml terkalibrasi;
- Pemanas listrik;
- Penangas air;
- Pendingin tegak;
- Termometer;
- Batu didih;
- *Stopwatch*.

B.5.4 Pengujian ketepatan larutan Luff Schoorl

- a) Pipet 25 ml larutan Luff Schoorl tambahkan 3 g KI dan 25 ml larutan H_2SO_4 3 M. Titar dengan larutan natrium tio sulfat 0,1 N dengan indikator kanji 0,5 %. Larutan natrium tio sulfat yang digunakan untuk titrasi seharusnya 25 ml;
- b) Pipet 10 ml larutan Luff Schoorl, masukkan dalam labu ukur 100 ml, encerkan dengan air suling dan kocok;
- c) Pipet 10 ml larutan hasil pengenceran tersebut dan masukkan ke dalam Erlenmeyer berisi 25 ml HCl 0,1 M;
- d) Masukkan Erlenmeyer tersebut ke dalam penangas air mendidih dan biarkan selama 1 jam, kemudian angkat dan didinginkan;
- e) Encerkan larutan yang telah dinginkan tersebut dengan air suling dan titar dengan larutan NaOH 0,1 M dengan indikator fenolftalin. Larutan NaOH 0,1 M yang dipergunakan untuk titrasi harus sekitar 5,5 ml – 6,5 ml;
- f) Pipet 10 ml larutan hasil pengenceran (e), masukkan ke dalam Erlenmeyer dan titar dengan HCl 0,1 M dengan indikator fenolftalin. Larutan HCl 0,1 M yang dipergunakan untuk titrasi harus sekitar 6,0 ml – 7,5 ml;
- g) Larutan Luff Schoorl harus mempunyai pH 9,3 – 9,4.

B.5.5 Cara kerja

- a) Timbang 2 g contoh dan masukkan ke dalam labu ukur 250 ml, tambahkan air dan kocok;
- b) Tambahkan 5 ml Pb-asetat setengah basa dan goyangkan;
- c) Teteskan 1 tetes larutan $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 10 %. Apabila timbul endapan putih maka penambahan Pb-asetat setengah basa sudah cukup;
- d) Tambahkan 15 ml larutan $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 10 %. Untuk menguji apakah Pb-asetat setengah basa sudah diendapkan seluruhnya, teteskan 1 tetes – 2 tetes $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 10 %. Apabila tidak timbul endapan berarti penambahan $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 10 % sudah cukup.

- e) Goyangkan dan tepatkan isi labu ukur sampai tanda garis dengan air suling, kocok 12 kali, biarkan dan saring;
- f) Pipet 10 ml larutan hasil penyaringan dan masukkan ke dalam Erlenmeyer 500 ml;
- g) Tambahkan 15 ml air suling dan 25 ml larutan Luff Schoorl (dengan pipet) serta beberapa butir batu didih;
- h) Hubungkan Erlenmeyer dengan pendingin tegak, panaskan diatas pemanas listrik, usahakan dalam waktu 3 menit sudah harus mulai mendidih.
- i) Panaskan terus selama 10 menit (pakai *stopwatch*) kemudian angkat dan segera dinginkan dalam bak berisi es (jangan digoyang);
- j) Setelah dingin tambahkan 10 ml larutan KI 20 % dan 25 ml larutan H₂SO₄ 25 % (hati-hati terbentuk gas CO₂);
- k) Titar dengan larutan natrium tio sulfat 0,1 N dengan indikator larutan kanji 0,5 % (V₁);
- l) Kerjakan penetapan blanko dengan 25 ml air dan 25 ml larutan Luff Schoorl seperti cara diatas (V₂)

B.5.6 Perhitungan

Gula reduksi (%), sebagai gula sebelum inversi = $\frac{W_1 \times fp}{W} \times 100\%$

dengan:

W₁ adalah bobot glukosa, berdasarkan Tabel B.5.1 (mg);

Jumlah natrium tiosulfat 0,1 N yang diperlukan untuk mencari bobot glukosa dalam tabel adalah pengurangan volume titar blanko dengan volume titar contoh (V₂ – V₁)

fp adalah faktor pengenceran;

W adalah bobot contoh (mg).

B.5.7 Ketelitian

Kisaran hasil dua kali ulangan maksimal 5 % dari nilai rata-rata hasil kadar gula reduksi atau deviasi (*RSD*) maksimal 3 %. Jika kisaran lebih besar dari 5 % atau *RSD* lebih besar dari 3 % analisis harus diulang kembali.

Tabel B.1 - Ekuivalen natrium tiosulfat

Na ₂ S ₂ O ₃ 0,1 M (ml)	Glukosa, fruktosa, gula invert (mg)	Laktosa (mg)	Maltosa (mg)
1	2,4	3,6	3,9
2	4,8	7,3	7,8
3	7,2	11,0	11,7
4	9,7	14,7	15,6
5	12,2	18,4	19,6
6	14,7	22,1	23,5
7	17,2	25,8	27,5
8	19,8	29,5	31,5
9	22,4	33,2	35,5
10	25,0	37,0	39,5
11	27,6	40,8	43,5
12	30,3	44,6	47,5
13	33,0	48,4	51,6
14	35,7	52,2	55,7
15	38,5	56,0	59,8

Tabel B.1 (lanjutan)

Na ₂ S ₂ O ₃ 0,1 M (ml)	Glukosa, fruktosa, gula invert (mg)	Laktosa (mg)	Maltosa (mg)
16	41,3	59,9	63,9
17	44,2	63,8	68,0
18	47,1	67,7	72,2
19	50,0	71,7	76,5
20	53,0	75,7	80,9
21	56,0	79,8	85,4
22	59,1	83,9	90,0
23	62,2	88,0	94,6

B.6 Sakarosa

B.6.1 Prinsip

Sakarosa dihidrolisis menjadi gula reduksi. Jumlah gula reduksi ditentukan dengan cara seperti pada penetapan kadar gula reduksi (Lampiran B.5). Hasil kali faktor kimia dengan selisih kadar gula sesudah dan sebelum inversi menunjukkan kadar sakarosa.

B.6.2 Pereaksi

- Larutan Luff Schoorl;
Larutkan 143,8 g Na₂CO₃ an hidrat dalam kira-kira 300 ml air suling. Sambil diaduk, tambahkan 50 g asam sitrat yang telah dilarutkan dengan 50 ml air suling. Tambahkan 25 g CuSO₄.5H₂O yang telah dilarutkan dengan 100 ml air suling. Pindahkan larutan tersebut ke dalam labu ukur 1 liter tepatkan sampai tanda garis dengan air suling dan kocok. Biarkan semalam dan saring bila perlu. Larutan ini mempunyai kepekatan Cu²⁺ 0,2 N dan Na₂CO₃ 2 M.
- Larutan kalium iodida, KI 20 %;
- Larutan asam sulfat, H₂SO₄ 25 %;
- Larutan natrium tio sulfat, Na₂S₂O₃ 0,1 N;
- Larutan asam klorida, HCl 25 %;
- Indikator kanji 0,5 %;
- Larutan natrium hidroksida, NaOH 30 %;
- Larutan indikator fenolftalein;
- Larutan timbal asetat setengah basa;
- Larutan amonium hidrogen fosfat, (NH₄)₂HPO₄ 10 %.

B.6.3 Peralatan

- Neraca analitik terkalibrasi dengan ketelitian 0,1 g;
- Erlenmeyer 500 ml terkalibrasi;
- Pipet volumetrik 10 ml, 25 ml dan 50 ml terkalibrasi;
- Labu ukur 100 ml, 250 ml dan 1000 ml terkalibrasi;
- Buret 50 ml terkalibrasi;
- Penangas listrik;
- Penangas air;
- Pendingin tegak;
- Termometer;
- Batu didih;
- *Stopwatch*.

B.6.4 Cara kerja

- Timbang 2 g contoh dan masukkan ke dalam labu ukur 250 ml, tambahkan air dan kocok;
- Tambahkan 5 ml Pb-asetat setengah basa dan goyangkan;
- Teteskan 1 tetes larutan $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 10 %. Apabila timbul endapan putih maka penambahan Pb-asetat setengah basa sudah cukup;
- Tambahkan 15 ml larutan $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 10 %. Untuk menguji apakah Pb-asetat setengah basa sudah diendapkan seluruhnya, teteskan 1 tetes – 2 tetes $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 10 %. Apabila tidak timbul endapan berarti penambahan $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 10 % sudah cukup.
- Goyangkan dan tepatkan isi labu ukur sampai tanda garis dengan air suling, kocok 12 kali, biarkan dan saring;
- Pipet 50 ml hasil penyaringan ke dalam labu ukur 100 ml;
- Tambahkan 25 ml HCl 25 %, pasang termometer dan lakukan hidrolisis didatas penangas air. Apabila suhu mencapai 68 °C - 70 °C suhu dipertahankan selama tepat 10 menit;
- Angkat dan bilas termometer dengan air lalu dinginkan;
- Tambahkan NaOH 30 % sampai netral (warna merah jambu) dengan indikator fenolftalin. Tepatkan sampai tanda tera dengan air suling, kocok 12 kali.
- Pipet 10 ml larutan tersebut dan masukkan ke dalam Erlenmeyer 500 ml;
- Tambahkan 15 ml air suling dan 25 ml larutan Luff Schoorl (dengan pipet) serta beberapa butir batu didih;
- Hubungkan Erlenmeyer dengan pendingin tegak, panaskan diatas pemanas listrik, usahakan dalam waktu 3 menit sudah harus mulai mendidih.
- Panaskan terus selama 10 menit (pakai *stopwatch*) kemudian angkat dan segera dinginkan dalam bak berisi es (jangan digoyang);
- Setelah dingin tambahkan 10 ml larutan KI 20 % dan 25 ml larutan H_2SO_4 25 % (hati-hati terbentuk gas CO_2);
- Titrat dengan larutan natrium tiosulfat 0,1 N dengan indikator larutan kanji 0,5 % (V_1);
- Kerjakan penetapan blanko dengan 25 ml air dan 25 ml larutan Luff Schoorl seperti cara diatas (V_2)

B.6.5 Perhitungan

Sakarosa (%) = $0.95 \times (\% \text{ gula sesudah inversi} - \% \text{ gula sebelum inversi})$

dengan:

Gula sebelum inversi (%) = gula reduksi (B.5.6)

$$\text{Gula sesudah inversi (\%)} = \frac{W_1 \times fp}{W} \times 100\%$$

dengan:

W_1 adalah bobot glukosa, berdasarkan Tabel B.5.1 (mg);

Jumlah natrium tiosulfat 0,1 N yang diperlukan untuk mencari bobot glukosa dalam tabel adalah pengurangan volume titrat blanko dengan volume titrat contoh ($V_2 - V_1$)

fp adalah faktor pengenceran;

W adalah bobot contoh (mg).

B.6.6 Ketelitian

Kisaran hasil dua kali ulangan maksimal 5 % dari nilai rata-rata hasil kadar sakarosa atau deviasi (*RSD*) maksimal 3 %. Jika kisaran lebih besar dari 5 % atau *RSD* lebih besar dari 3 % analisis harus diulang kembali.

B.7 Cemaran logam

B.7.1 Penetapan cemaran logam Cu dan Pb

B.7.1.1 Prinsip

Destruksi contoh dengan cara pengabuan kering pada 500 °C yang dilanjutkan dengan pelarutan dalam larutan asam. Logam yang terlarut dihitung menggunakan alat Spektrofotometer Serapan Atom (SSA).

B.7.1.2 Peralatan

- Neraca analitik terkalibrasi dengan ketelitian 0,1 g;
- Cawan porselin/platina/kwarsa dengan kapasitas 50 ml sampai 100 ml;
- Penangas listrik;
- Kertas *Whatman* No. 41;
- Tanur terkalibrasi dengan ketelitian 1°C;
- Spektrofotometer Serapan Atom beserta kelengkapannya (lampu katoda Cu dan Pb) terkalibrasi;
- Pipet ukur berskala 0,05 ml atau mikro buret terkalibrasi;
- Labu ukur 50 ml, 100 ml, dan 1000 ml, terkalibrasi;
- Gelas ukur kapasitas 10 ml;
- Gelas piala 250 ml;
- Penangas air.

B.7.1.3 Pereaksi

- a) Larutan asam nitrat, HNO_3 pekat (65%, Bj 1,4);
- b) Larutan asam klorida, HCl pekat (37%, Bj 1,19);
- c) Larutan asam nitrat, HNO_3 0,1N;
Encerkan 7 ml HNO_3 65% dengan air suling dalam labu ukur 1000 ml dan encerkan sampai tanda garis.
- d) Larutan asam klorida, HCl 6N;
Encerkan 500 ml HCl 37% dengan air suling dalam labu ukur 1000 ml dan encerkan sampai tanda garis.
- e) Larutan $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 10% dalam alkohol;
Larutkan 10 g $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ dengan alkohol 95 % menjadi 100 ml.
- f) Larutan baku 1000 µg/ml Cu;
Larutkan 1,000 g Cu dengan 7 ml HNO_3 pekat dalam gelas piala 250 ml dan masukkan ke dalam labu ukur 1000 ml kemudian encerkan dengan air suling sampai tanda garis. Alternatif lain, bisa digunakan larutan baku Cu 1000 µg/ml siap pakai.
- g) Larutan baku 200 µg/ml Cu;
Pipet 10 ml larutan baku 1000 µg/ml Cu ke dalam labu ukur 50 ml kemudian encerkan dengan air suling sampai tanda garis kemudian dikocok. Larutan baku kedua ini memiliki konsentrasi 200 µg/ml Cu.

- h) Larutan baku 20 µg/ml Cu;
Pipet 10 ml larutan baku 200 µg/ml Cu ke dalam labu ukur 100 ml kemudian encerkan dengan air suling sampai tanda garis kemudian dikocok. Larutan baku ketiga ini memiliki konsentrasi 20 µg/ml Cu.
- i) Larutan baku kerja Cu;
Pipet ke dalam labu ukur 100 ml masing-masing sebanyak 0 ml, 0,5 ml, 1 ml; 2 ml; 4 ml; 7 ml dan 9 ml larutan baku 20 µg/ml kemudian tambahkan 5 ml larutan HNO₃ 1 N atau HCl 6 N, dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis kemudian kocok. Larutan baku kerja ini memiliki konsentrasi 0 µg/ml; 0,1 µg/ml; 0,2 µg/ml; 0,4 µg/ml; 0,8 µg/ml; 1,4 µg/ml dan 1,8 µg/ml Cu.
- j) Larutan baku 1000 µg/ml Pb;
Larutkan 1,000 g Pb dengan 7 ml HNO₃ pekat dalam gelas piala 250 ml dan masukkan ke dalam labu ukur 1000 ml kemudian encerkan dengan air suling sampai tanda garis. Alternatif lain, bisa digunakan larutan baku Pb 1000 µg/ml siap pakai.
- k) Larutan baku 50 µg/ml Pb;
Pipet 5,0 ml larutan baku 1000 µg/ml Pb ke dalam labu ukur 100 ml dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis kemudian kocok. Larutan baku kedua ini memiliki konsentrasi Pb 50 µg/ml.
- l) Larutan baku kerja Pb;
Pipet ke dalam labu ukur 100 ml masing-masing sebanyak 0 ml, 0,2 ml; 0,5 ml; 1 ml; 2 ml; 3 ml dan 4 ml larutan baku 50 µg/ml kemudian tambahkan 5 ml larutan HNO₃ 1 N atau HCl 6 N, dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis kemudian kocok. Larutan baku kerja ini memiliki konsentrasi 0 µg/ml; 0,1 µg/ml; 0,25 µg/ml; 0,5 µg/ml; 1,0 µg/ml; 1,5 µg/ml dan 2,0 µg/ml Pb.

B.7.1.4 Cara kerja

- a) Timbang 5 g sampai 10 g contoh dengan teliti dalam cawan porselin/platina/kuarsa (m);
- b) Tempatkan cawan berisi contoh uji di atas penangas listrik dan panaskan secara bertahap sampai contoh uji tidak berasap lagi; (bisa ditambahkan 10 ml MgNO₃.6H₂O 10% dalam alkohol untuk mempercepat pengabuan)
- c) Lanjutkan pengabuan dalam tanur 500 °C ± 5 °C sampai abu berwarna putih, bebas dari karbon;
- d) Apabila abu belum bebas dari karbon yang ditandai dengan warna keabu-abuan, basahkan dengan beberapa tetes air dan tambahkan tetes demi tetes HNO₃ pekat kira-kira 0,5 ml sampai dengan 3 ml;
- e) Keringkan cawan di atas penangas listrik dan masukkan kembali ke dalam tanur pada suhu 500°C kemudian lanjutkan pemanasan sampai abu menjadi putih. Penambahan HNO₃ pekat bisa diulangi apabila abu masih berwarna keabu-abuan;
- f) Larutkan abu berwarna putih dalam 5 ml HCl 6N atau 5 ml HNO₃ 1N sambil dipanaskan di atas penangas listrik atau penangas air selama 2 menit sampai 3 menit dan masukkan ke dalam labu ukur 50 ml kemudian tepatkan hingga tanda garis dengan air suling (V);
- g) Jika perlu, saring larutan menggunakan kertas saring *Whatman* No.41 ke dalam labu ukur 50 ml;
- h) Siapkan larutan blanko dengan penambahan pereaksi dan perlakuan yang sama seperti contoh;
- i) Baca absorbans larutan baku kerja dan larutan contoh terhadap blanko menggunakan SSA pada panjang gelombang maksimum sekitar 324,7 nm untuk Cu dan 217 nm untuk Pb);
- j) Buat kurva kalibrasi antara konsentrasi logam (µg/ml) sebagai sumbu X dan absorbans sebagai sumbu Y;
- k) Plot hasil pembacaan larutan contoh terhadap kurva kalibrasi;
- l) Hitung konsentrasi logam dalam contoh.

B.7.1.5 Perhitungan

$$\text{Konsentrasi logam (mg/kg)} = \frac{C}{m} \times V$$

dengan:

C adalah konsentrasi logam dari kurva kalibrasi, ($\mu\text{g/ml}$);

V adalah volume larutan akhir, (ml);

m adalah bobot contoh, (g).

B.7.1.6 Ketelitian

Kisaran hasil dua kali ulangan deviasi (RSD) maksimal 11%. Jika RSD lebih besar dari 11% maka analisis harus diulang.

B.7.2 Penetapan timah (Sn)**B.7.2.1 Prinsip**

Contoh didekstruksi dengan HNO_3 dan HCl kemudian ditambahkan KCl untuk mengurangi gangguan. Sn dibaca menggunakan spektrofotometer serapan atom pada panjang gelombang maksimum 235,5 nm dengan nyala oksidasi $\text{N}_2\text{O}-\text{C}_2\text{H}_2$.

B.7.2.2 Pereaksi

- Larutan kalium klorida, 10 mg/ml K;
larutkan 1,91 g KCl dengan air menjadi 100 ml.
- Asam nitrat pekat, HNO_3 pekat;
- Asam klorida pekat, HCl pekat;
- Larutan baku 1000 mg/l Sn;
Larutkan 1,000 g Sn dengan 200 ml asam HCl pekat dalam labu ukur 1000 ml, tambahkan 200 ml air suling, dinginkan pada suhu ruang dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis.
- Larutan baku kerja Sn.
Pipet 10 ml HCl pekat dan 1,0 ml larutan KCl ke dalam masing-masing labu ukur 100 ml. Tambahkan masing-masing 0 ml; 0,5 ml; 1,0 ml; 1,5 ml; 2,0 ml dan 2,5 ml larutan baku 1000 mg/L Sn dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis. Larutan baku kerja ini memiliki konsentrasi 0 $\mu\text{g/ml}$; 5 $\mu\text{g/ml}$; 10 $\mu\text{g/ml}$; 15 $\mu\text{g/ml}$; 20 $\mu\text{g/ml}$ dan 25 $\mu\text{g/ml}$ Sn.

B.7.2.3 Peralatan

- Neraca analitik terkalibrasi dengan ketelitian 0,1 g;
- Erlenmeyer 250 ml;
- Penangas listrik;
- Tanur terkalibrasi dengan ketelitian 1 $^{\circ}\text{C}$;
- Spektrofotometer serapan atom beserta kelengkapannya (lampu katoda sn) terkalibrasi;
- Pipet ukur berskala 0,05 ml atau mikro buret terkalibrasi;
- Labu ukur 50 ml, 100 ml, dan 1000 ml, terkalibrasi;
- Gelas ukur kapasitas 50 ml;
- Gelas piala 250 ml;
- Penangas air.

B.7.2.4 Cara kerja

- Timbang 10 g sampai 20 g dengan teliti ke dalam erlemeyer 250 ml, tambahkan 30 ml HNO₃ pekat;
- Panaskan perlahan selama 15 menit di dalam lemari asam, hindari terjadinya percikan yang berlebihan;
- Lanjutkan pemanasan sehingga sisa volume 3 ml sampai 6 ml atau sampai contoh mulai kering pada bagian bawahnya, hindari terbentuknya arang;
- Angkat Erlenmeyer dari penangas listrik, tambahkan 25 ml HCl pekat, dan panaskan sampai selama 15 menit sampai letupan dari uap Cl₂ berhenti;
- Tingkatkan pemanasan dan didihkan sehingga sisa volume 10 ml sampai 15 ml;
- Tambahkan 40 ml air suling, aduk, dan tuangkan ke dalam labu ukur 100 ml, bilas Erlenmeyer tersebut dengan 10 ml air suling;
- Tambahkan 1,0 ml KCl, dinginkan pada temperatur ruang, tepatkan hingga tanda garis dengan air suling dan saring.
- Siapkan larutan blanko dengan penambahan pereaksi dan perlakuan yang sama seperti contoh;
- Baca absorbans larutan baku kerja dan larutan contoh terhadap blanko menggunakan SSA pada panjang gelombang maksimum 235,5 nm dengan nyala oksidasi N₂O-C₂H₂);
- Buat kurva kalibrasi antara konsentrasi logam (µg/ml) sebagai sumbu X dan absorbans sebagai sumbu Y;
- Plot hasil pembacaan larutan contoh terhadap kurva kalibrasi;
- Lakukan pengerjaan duplo;
- Hitung konsentrasi logam dalam contoh.

B.7.2.5 Perhitungan

$$\text{Konsentrasi Sn (mg/kg)} = \frac{C}{m} \times V$$

dengan:

C adalah konsentrasi Sn dari kurva kalibrasi, (µg/ml)

V adalah volume larutan akhir, (ml);

m adalah bobot contoh, (g).

B.7.2.6 Ketelitian

Kisaran hasil dua kali ulangan deviasi (RSD) maksimal 11%. Jika RSD lebih besar dari 11%, maka analisis harus diulang kembali.

B.7.3 Penetapan raksa (Hg)**B.7.3.1 Prinsip**

Reaksi antara senyawa raksa dengan NaBH₄ atau SnCl₂ dalam keadaan asam akan membentuk gas atomik Hg. Jumlah Hg yang terbentuk sebanding dengan absorbans Hg yang dibaca menggunakan Spektrofotometer Serapan Atom tanpa nyala pada panjang gelombang maksimum 253,7 nm.

B.7.3.2 Pereaksi

- a) Asam sulfat, H_2SO_4 9M;
- b) Asam nitrat, HNO_3 7M;
- c) Batu didih;
- d) Campuran HNO_3 : HClO_4 (1:1);
- e) Larutan Natrium molibdat 2%.
- f) Larutan pereduksi;
Campurkan 50 ml H_2SO_4 dengan 300 ml air suling dalam gelas piala 500 ml dan dinginkan sampai suhu ruang kemudian tambahkan 15 g NaCl, 15 g hidroksilamin sulfat, dan 25 g SnCl_2 . Pindahkan kedalam labu ukur 500 ml dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis.
- g) Larutan NaBH_4 ;
Larutkan 3 g serbuk NaBH_4 dan 3 g NaOH dengan air suling dalam labu ukur 500 ml.
- h) Larutan pengencer;
Masukkan 300 ml sampai 500 ml air suling kedalam labu ukur 1000 ml dan tambahkan 58 ml HNO_3 kemudian 67 ml H_2SO_4 . Encerkan dengan air suling sampai tanda garis dan kocok.
- i) Larutan baku 1000 $\mu\text{g/ml}$ Hg;
Larutkan 0,1354 g HgCl_2 dengan kira-kira 25 ml air suling dalam gelas piala 250 ml dan masukkan ke dalam labu ukur 100 ml kemudian encerkan dengan air suling sampai tanda garis.
- j) Larutan baku 1 $\mu\text{g/ml}$ Hg;
Pipet 1 ml larutan baku 1000 mg/l Hg ke dalam labu ukur 1000 ml dan encerkan dengan larutan pengencer sampai tanda garis kemudian kocok. Larutan baku kedua ini memiliki konsentrasi 1 mg/l.
- k) Larutan baku kerja Hg;
Pipet masing-masing 0,25 ml; 0,5 ml; 1 ml; dan 2 ml larutan baku 1 mg/l ke dalam labu ukur 100 ml terpisah dan encerkan dengan larutan pengencer sampai tanda garis. Larutan baku kerja ini memiliki konsentrasi 0,0025 $\mu\text{g/ml}$; 0,005 $\mu\text{g/ml}$; 0,01 $\mu\text{g/ml}$; 0,02 $\mu\text{g/ml}$ Hg.

B.7.3.3 Peralatan

- Spektrofotometer Serapan Atom yang dilengkapi lampu katoda Hg dan generator uap hidrida ("HVG");
- Neraca analitik terkalibrasi dengan ketelitian 0,1 g;
- Labu destruksi 250 ml berdasar bulat;
- Pendingin terbuat dari borosilikat, diameter 12 mm – 18 mm, tinggi 400 mm diisi dengan cincin Raschig setinggi 100 mm, dan dilapisi dengan batu didih berdiameter 4 mm di atas cincin setinggi 20 mm;
- Labu ukur 100 ml, 500 ml, dan 1000 ml terkalibrasi;
- Penangas listrik;
- Gelas ukur 25 ml;
- Pipet ukur berskala 0,05 ml atau mikro buret terkalibrasi.

B.7.3.4 Cara kerja**B.7.3.4.1 Pengabuan basah**

- a) Timbang 5 g contoh dengan teliti ke dalam labu destruksi dan tambahkan 25 ml H_2SO_4 9M, 20 ml HNO_3 7M, 1 ml larutan natrium molibdat 2%, dan 5 batu didih sampai 6 batu didih;
- b) Hubungkan labu destruksi dengan pendingin dan panaskan di atas penangas listrik selama 1 jam. Hentikan pemanasan dan biarkan selama 15 menit;
- c) Tambahkan 20 ml campuran $\text{HNO}_3 - \text{HClO}_4$ (1:1) melalui pendingin;
- d) Hentikan aliran air pada pendingin dan panaskan dengan panas tinggi hingga timbul uap putih. Lanjutkan pemanasan selama 10 menit dan dinginkan;
- e) Tambahkan 10 ml air suling melalui pendingin dengan hati-hati sambil labu digoyang-goyangkan;
- f) Didihkan lagi selama 10 menit;
- g) Matikan pemanas dan cuci pendingin dengan 15 ml air suling sebanyak 3 kali kemudian dinginkan sampai suhu kamar;
- h) Pindahkan larutan destruksi contoh ke dalam labu ukur 100 ml secara kuantitatif dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis;
- i) Pipet 25 ml larutan di atas ke dalam labu ukur 100 ml dan encerkan dengan larutan pengencer sampai tanda garis;
- j) Siapkan larutan blanko dengan penambahan pereaksi dan perlakuan yang sama seperti contoh;
- k) Tambahkan larutan pereduksi ke dalam larutan baku kerja Hg, larutan contoh, dan larutan blanko pada alat "HVG";
- l) Baca absorbans larutan baku kerja, larutan contoh, dan larutan blanko menggunakan SSA tanpa nyala pada panjang gelombang 253,7 nm;
- m) Buat kurva kalibrasi antara konsentrasi logam ($\mu\text{g/ml}$) sebagai sumbu X dan absorbans sebagai sumbu Y;
- n) Plot hasil pembacaan larutan contoh terhadap kurva kalibrasi;
- o) Lakukan pengerjaan duplo;
- p) Hitung konsentrasi Hg dalam contoh.

B.7.3.4.2 Destruksi menggunakan *microwave* atau destruksi sistem tertutup

- a) timbang 1 g contoh dengan teliti ke dalam tabung destruksi dan tambahkan 5 ml HNO_3 pekat kemudian tutup rapat.
- b) masukkan ke dalam oven *microwave* dan kerjakan sesuai dengan petunjuk pemakaian alat;
- c) pindahkan larutan destruksi contoh ke dalam labu ukur 25 ml secara kuantitatif dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis;
- d) siapkan larutan blanko dengan penambahan pereaksi dan perlakuan yang sama seperti contoh;
- e) tambahkan larutan pereduksi (Na_2BH_4 atau SnCl_2) ke dalam larutan baku kerja, larutan contoh, dan larutan blanko pada alat "HVG";
- f) baca absorbans larutan baku kerja, larutan contoh, dan larutan blanko menggunakan SSA tanpa nyala pada panjang gelombang 253,7 nm;
- g) buat kurva kalibrasi antara konsentrasi logam ($\mu\text{g/ml}$) sebagai sumbu X dan absorbans sebagai sumbu Y;
- h) plot hasil pembacaan larutan contoh terhadap kurva kalibrasi;
- i) lakukan pengerjaan duplo;
- j) hitung konsentrasi Hg dalam contoh;

B.7.3.5 Perhitungan

$$\text{Konsentrasi Hg (mg/kg)} = \frac{C}{m} \times V$$

dengan:

C adalah konsentrasi Hg dari kurva kalibrasi, (µg/ml)

V adalah volume larutan akhir, (ml);

m adalah bobot contoh, (g).

B.7.3.6 Ketelitian

Kisaran hasil dua kali ulangan deviasi (RSD) maksimal 16%. Jika RSD lebih besar dari 16%, maka analisis harus diulang kembali.

B.8 Cemarkan arsen (As)**B.8.1 Prinsip**

Contoh didestruksi dengan asam menjadi larutan arsen. Larutan As^{5+} direduksi dengan KI menjadi As^{3+} dan direaksikan dengan NaBH_4 atau SnCl_2 sehingga terbentuk AsH_3 yang kemudian dibaca dengan SSA pada panjang gelombang 193,7 nm.

B.8.2 Peralatan

- Spektrofotometer Serapan Atom yang dilengkapi dengan lampu katoda As dan generator uap hidrida ("HVG");
- Neraca analitik terkalibrasi dengan ketelitian 0,1 g
- Labu Kjeldahl 250 ml;
- Labu ukur 50 ml, 100 ml, 500 ml, dan 1000 ml terkalibrasi;
- Pemanas listrik;
- Pipet volumetrik 25 ml;
- Cawan porselen kapasitas 50 ml.
- Gelas ukur 25 ml
- Tanur terkalibrasi dengan ketelitian 1°C;
- Pipet ukur berskala 0,05 ml atau mikro buret terkalibrasi;

B.8.3 Pereaksi

- a) Asam nitrat, HNO_3 pekat;
- b) asam perklorat, HClO_4 pekat;
- c) Natrium boronhidrida, NaBH_4 ;
Larutkan 3 g NaBH_4 dan 3 g NaOH dengan air suling sampai tanda garis dalam labu ukur 500 ml.
- d) Asam klorida, HCl 8M;
Larutkan 66 ml HCl 37% kedalam labu ukur 100 ml dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis.
- e) Timah (II) klorida, $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 10%;
Timbang 50 g $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ke dalam piala gelas 200 ml dan tambahkan 100 ml HCl 37%. Panaskan hingga larutan jernih dan dinginkan kemudian tuangkan ke dalam labu ukur 500 ml dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis.
- f) Kalium iodida, KI 20%;
Timbang 20 g KI ke dalam labu ukur 100 ml dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis (larutan harus dibuat langsung sebelum digunakan).

- g) Larutan $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ 75 mg/ml;
Larutkan 3,75 g MgO dengan 30 ml H_2O secara hati-hati, tambahkan 10 ml HNO_3 , dinginkan dan encerkan hingga 50 ml dengan air suling;
- h) Larutan baku 1000 $\mu\text{g/ml}$ As;
Larutkan 1,3203 g As_2O_3 kering dengan sedikit NaOH 20 % dan netralkan dengan HCl atau HNO_3 1:1 (1 bagian asam : 1 bagian air). Masukkan ke dalam labu ukur 1 liter dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis.
- i) Larutan baku 100 $\mu\text{g/ml}$ As;
Pipet 10 ml larutan baku arsen 1000 $\mu\text{g/ml}$ ke dalam labu ukur 100 ml dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis. Larutan baku kedua ini memiliki konsentrasi 100 $\mu\text{g/ml}$ As.
- j) Larutan baku 1 $\mu\text{g/ml}$ As;
Pipet 1 ml larutan standar arsen 100 mg/l ke dalam labu ukur 100 ml dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis. Larutan baku ketiga ini memiliki konsentrasi 1 $\mu\text{g/ml}$ As.
- k) Larutan baku kerja As;
Pipet masing-masing 1,0 ml; 2,0 ml; 3,0 ml; 4,0 ml dan 5,0 ml larutan baku 1 $\mu\text{g/ml}$ As ke dalam labu ukur 100 ml terpisah dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis kemudian kocok. Larutan baku kerja ini memiliki konsentrasi 0,01 $\mu\text{g/ml}$; 0,02 $\mu\text{g/ml}$; 0,03 $\mu\text{g/ml}$; 0,04 $\mu\text{g/ml}$ dan 0,05 $\mu\text{g/ml}$ As.

B.8.4 Cara kerja

B.8.4.1 Pengabuan basah

- a) Timbang 5 g sampai 10 g contoh kedalam labu Kjeldahl 250 ml, tambahkan 5 ml sampai 10 ml HNO_3 pekat dan 4 ml sampai 8 ml H_2SO_4 pekat dengan hati-hati;
- b) Setelah reaksi selesai, panaskan dan tambahkan HNO_3 pekat sedikit demi sedikit sehingga contoh berwarna coklat atau kehitaman;
- c) Tambahkan 2 ml HClO_4 70 % sedikit demi sedikit dan panaskan lagi sehingga larutan menjadi jernih atau berwarna kuning (jika terjadi pengarangan setelah penambahan asam perklorat, tambahkan lagi sedikit HNO_3 pekat);
- d) Dinginkan, tambahkan 15 ml H_2O dan 5 ml amonim oksalat jenuh;
- e) Panaskan sehingga timbul uap SO_3 di leher labu;
- f) Dinginkan, pindahkan secara kuantitatif ke dalam labu ukur 50 ml dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis;
- g) Pipet 25 ml larutan diatas dan tambahkan 2 ml HCl 8 M, 0.1 ml KI 20% kemudian kocok dan biarkan minimal 2 menit;
- h) Siapkan larutan blanko dengan penambahan pereaksi dan perlakuan yang sama seperti contoh;
- i) Tambahkan larutan pereduksi (NaBH_4) ke dalam larutan baku kerja As, larutan contoh, dan larutan blanko pada alat "HVG";
- j) Baca absorbans larutan baku kerja, larutan contoh, dan larutan blanko menggunakan SSA tanpa nyala pada panjang gelombang 193,7 nm;
- k) Buat kurva kalibrasi antara konsentrasi logam ($\mu\text{g/ml}$) sebagai sumbu X dan absorbans sebagai sumbu Y;
- l) Plot hasil pembacaan larutan contoh terhadap kurva kalibrasi;
- m) Lakukan pengerjaan duplo;
- n) Hitung konsentrasi As dalam contoh.

B.8.4.2 Destruksi menggunakan *microwave* atau destruksi sistem tertutup

- Timbang 1 g contoh ke dalam tabung destruksi dan tambahkan 5 ml HNO₃ pekat kemudian tutup rapat.
- Masukkan ke dalam oven *microwave* dan kerjakan sesuai dengan petunjuk pemakaian alat;
- Setelah dingin, pindahkan larutan destruksi ke dalam labu ukur 25 ml secara kuantitatif dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis;
- Pipet 10 ml larutan diatas kedalam labu dasar bulat 50 ml, tambahkan 1 ml larutan Mg(NO₃)₂, panaskan menggunakan penangas listrik hingga kering kemudian abukan pada tanur dengan suhu 450 °C ± 5°C;
- Dinginkan, larutkan dengan 2 ml HCl 8 M, 0.1 ml KI 20 % dan biarkan minimal 2 menit;
- Siapkan larutan blanko dengan penambahan pereaksi dan perlakuan yang sama seperti contoh;
- Tambahkan larutan pereduksi ke dalam larutan baku kerja As, larutan contoh, dan larutan blanko pada alat "HVG";
- Baca absorbans larutan baku kerja, larutan contoh, dan larutan blanko menggunakan SSA tanpa nyala pada panjang gelombang 193,7 nm;
- Buat kurva kalibrasi antara konsentrasi logam (µg/ml) sebagai sumbu X dan absorbans sebagai sumbu Y;
- Plot hasil pembacaan larutan contoh terhadap kurva kalibrasi;
- Lakukan pengerjaan duplo;
- Hitung konsentrasi As dalam contoh.

B.8.5 Perhitungan

$$\text{Konsentrasi As (mg/kg)} = \frac{C}{m} \times V$$

dengan:

C adalah konsentrasi As dari kurva kalibrasi, (µg/ml)

V adalah volume larutan akhir, (ml);

m adalah bobot contoh, (g).

B.8.6 Ketelitian

Kisaran hasil dua kali ulangan deviasi (RSD) maksimal 16%. Jika RSD lebih besar dari 16%, maka analisis harus diulang kembali.

B.9 Cemarkan mikroba**B.9.1 Persiapan dan homogenisasi contoh untuk uji angka lempeng total, bakteri *coliform* dan *E. coli*, *staphylococcus aureus* dan kapang/khamir****B.9.1.1 Prinsip**

Pembebasan sel-sel bakteri yang mungkin terlindung oleh partikel makanan dan untuk menggiatkan kembali sel-sel bakteri yang mungkin viabilitasnya berkurang karena kondisi yang kurang menguntungkan dalam makanan. Persiapan dan homogenisasi contoh bertujuan agar bakteri terdistribusi dengan baik di dalam contoh makanan yang ditetapkan.

B.9.1.2 Larutan Pengencer*Buffered Pepton Water (BPW)*

- Pepton	10 g
- Natrium klorida	5 g
- <i>Disodium hydrogen phosphate</i>	3,5 g
- <i>Kalium dihydrogen phosphate</i>	1,5 g
- Air suling	1000 ml

Larutkan bahan-bahan diatas menjadi 1000 ml dengan air suling dan atur pH menjadi 7,0. Pipet 225 ml larutan tersebut ke dalam botol 500 ml dan 9 ml ke dalam tabung reaksi. Sterilkan menggunakan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit.

B.9.1.3 Peralatan

- Alat homogenisasi yang sesuai (blender) dengan kecepatan putaran 8000 rpm – 45000 rpm;
- Neraca analitik terkalibrasi dengan ketelitian 0,1 mg
- Gelas piala steril
- Labu Erlenmeyer steril
- Botol pengencer steril
- Pipet volumetrik steril
- Tabung reaksi
- Alat pembuka kaleng steril
- Pisau, pinset, sendok, gunting, dan spatula steril;
- Labu ukur 50 ml, 100 ml, 500 ml, dan 1000 ml terkalibrasi;
- Penangas listrik.

B.9.1.4 Homogenisasi contoh

- a) Timbang 25 g contoh dan masukkan ke dalam Erlenmeyer yang telah berisi 225 ml larutan pengencer sehingga diperoleh pengenceran 1:10.
- b) Kocok campuran beberapa kali sehingga homogen.

B.9.2 Angka lempeng total (metode *plate count*)**B.9.2.1 Prinsip**

Pertumbuhan bakteri mesofil aerob setelah contoh diinkubasikan dalam pembenihan yang sesuai selama 48 jam pada suhu 35 °C ± 1 °C.

B.9.2.2 Peralatan

- Cawan petri gelas / plastik diameter 50 mm – 60 mm steril;
- Pipet ukur 1ml, 5 ml, dan 10 ml;
- Penangas air 45 °C ± 1°C;
- Inkubator terkalibrasi;
- Alat penghitung koloni (*colony counter*);
- Autoklaf terkalibrasi;
- Oven / alat sterilisasi kering terkalibrasi.

B.9.2.3 Pembenihan

plate count agar (PCA)

- <i>Pancreatic digest of caseine</i>	5 g
- <i>Yeast extract</i>	2,5 g
- Glukosa	1 g
- Agar	15 g
- Air suling	1000 ml

Larutkan bahan-bahan diatas menjadi 1000 ml dengan air suling dan atur pH menjadi 7,0. Masukkan sebanyak 300 ml – 350 ml larutan tersebut ke dalam botol 500 ml. Sterilkan menggunakan autoklaf pada suhu 121 °C selama 15 menit.

B.9.2.4 Cara kerja

- Buat pengenceran 1 : 100 dengan mencampurkan 1 ml dari contoh dengan tingkat pengenceran 1 : 10 ke dalam tabung reaksi yang telah berisi 9 ml larutan pengencer *buffered peptone water* yang telah disterilisasi.
- Pipet masing-masing 1 ml dari pengenceran $10^1 - 10^2$ ke dalam cawan petri steril secara duplo;
- Tuangkan 12 ml – 15 ml media PCA yang masih cair dengan suhu $45\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ ke dalam masing-masing cawan petri dalam waktu 15 menit dari pengenceran pertama;
- Goyangkan cawan petri dengan hati-hati (putar dan goyang ke depan, ke belakang, ke kanan dan ke kiri) sehingga contoh dan pembenihan tercampur merata;
- Kerjakan pemeriksaan blanko dengan mencampur air pengencer untuk setiap contoh yang diperiksa;
- Biarkan sampai campuran dalam cawan petri memadat;
- Masukkan semua cawan petri dengan posisi terbalik ke dalam lemari pengering pada suhu $35\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ selama 48 jam;
- Catat pertumbuhan koloni pada setiap cawan petri yang mengandung 25 koloni – 250 koloni setelah 48 jam.

B.9.2.5 Perhitungan

Angka lempeng total (koloni/g) = $n \times F$

dengan :

n adalah rata – rata koloni dari dua cawan petri dari satu pengenceran, dinyatakan dengan koloni/g;

F adalah faktor pengenceran dari rata-rata koloni yang dipakai.

B.9.2.6 Pernyataan hasil**B.9.2.6.1 Cara menghitung**

- Pilih cawan petri dari satu pengenceran yang menunjukkan jumlah koloni antara 25 koloni – 250 koloni setiap cawan petri. Hitung semua koloni dalam cawan petri menggunakan alat penghitung koloni. Hitung rata-rata jumlah koloni dan kalikan dengan faktor pengenceran. Nyatakan hasilnya sebagai jumlah bakteri per gram;
- Jika salah satu dari dua cawan petri terdapat jumlah koloni lebih kecil dari 25 koloni atau lebih besar dari 250 koloni, hitung jumlah koloni yang terletak antara 25 koloni – 250 koloni dan kalikan dengan faktor pengenceran. Nyatakan hasilnya sebagai jumlah bakteri per gram;

Contoh :

10^{-2}	10^{-3}
120	25
105	20

$$ALT = \frac{120 + 105 + 25}{[(1 \times 2) + (0,1 \times 1) \times 10^{-2}]} = 124,9375$$

- c) Jika hasil dari dua pengenceran jumlahnya berturut-turut terletak antara 25 koloni – 250 koloni, hitung jumlah koloni dari masing-masing pengenceran koloni per g dengan rumus :

$$ALT = \frac{\sum C}{[(1 \times n_1) + (0,1 \times n_2) \times d]}$$

dengan :

C adalah jumlah koloni dari tiap-tiap petri;

n_1 adalah jumlah petri dari pengenceran pertama yang dihitung;

n_2 adalah jumlah petri dari pengenceran kedua;

d adalah pengenceran pertama yang dihitung;

Contoh :

10^{-2}	10^{-3}
131	30
143	25

$$ALT = \frac{131 + 143 + 30 + 25}{[(1 \times 2) + (0,1 \times 2) \times 10^{-2}]} = 164,3357$$

- d) Jika jumlah koloni dari masing-masing petri lebih dari 25 koloni nyatakan sebagai jumlah bakteri perkiraan;
- jika jumlah koloni per cm^2 kurang dari 100 koloni maka nyatakan hasilnya sebagai jumlah perkiraan : jumlah bakteri dikalikan faktor pengenceran.

Contoh :

10^{-2}	10^{-3}	Jumlah bakteri perkiraan
~	640	$1000 \times 640 = 640.000 (6.4 \times 10^5)$

- jika jumlah koloni per cm^2 lebih dari 100 koloni maka nyatakan hasilnya: area x faktor pengenceran x 100 contoh rata-rata jumlah koloni 110 per cm^2

10^{-2}	10^{-3}	area (cm^2)	jumlah bakteri perkiraan
~	7150	65	$> 65 \times 10^3 \times 100 = > 6500.000 (6.5 \times 10^6)$
~	6490	59	$> 59 \times 10^3 \times 100 = > 5900.000 (5.9 \times 10^6)$

- e) Jika jumlah koloni dari masing-masing koloni yang tumbuh pada cawan petri kurang dari 25 maka nyatakan jumlah bakteri perkiraan lebih kecil dari 25 koloni dikalikan pengenceran yang terendah;

- f) Menghitung koloni perambat;
Perambatan pada koloni ada 3 macam, yaitu :
- merupakan rantai yang tidak terpisah;
 - perambat yang terjadi diantara dasar cawan petri dan pembenihan;
 - perambatan yang terjadi pada pinggir atau perukuan pembenihan.
- Jika terjadi hanya satu perambatan (seperti rantai) maka koloni dianggap satu. Jika terbentuk satu atau lebih rantai terbentuk dan berasal dari sumber yang terpisah-pisah, maka uap sumber dihitung sebagai satu koloni.

B.9.2.6.2 Cara menghitung dan membulatkan angka

Dalam melaporkan jumlah koloni atau jumlah koloni perkiraan hanya 2 angka penting yang digunakan, yaitu angka pertama dan kedua (dimulai dari kiri),

- a) Jika angka ketiga lebih besar dari 5 maka bulatkan ke atas.
contohnya : 528 dilaporkan sebagai 530 penulisannya $5,3 \times 10^2$
- b) Jika angka ketiga kurang dari 5 maka bulatkan kebawah.
contohnya : 523 dilaporkan sebagai 520 penulisannya $5,2 \times 10^2$
- c) Jika angka ketiga sama dengan 5 maka bulatkan sebagai berikut :
 - Bulatkan ke atas jika angka kedua merupakan angka ganjil.
contohnya : 575 dilaporkan sebagai 580 penulisannya $5,8 \times 10^2$
 - Bulatkan ke bawah jika angka kedua merupakan angka genap
contohnya : 565 dilaporkan sebagai 560 penulisannya $5,6 \times 10^2$

B.9.3 Bakteri *coliform* dan *E. coli*

B.9.3.1 Prinsip

Pertumbuhan bakteri *coliform* ditandai dengan terbentuknya gas pada tabung Durham, yang diikuti dengan uji biokimia dan selanjutnya dirujuk pada Tabel APM (Angka Paling Mungkin).

B.9.3.2 Peralatan

- Cawan petri gelas ukuran 15 x 100 mm atau plastik ukuran 15 x 90 mm, steril;
- Pipet Mohr 1 ml dan 10 ml berskala;
- Botol pengenceran (± 20 ml) gelas borosilikat yang resistan, dengan sumbat karet atau tutup uliran;
- Lemari pengering (Inkubator), $35^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$;
- Tabung reaksi dan tabung Durham;
- Rak untuk tabung reaksi;
- Jarum inokulasi (ose), dengan diameter dalam kira-kira 3 mm;
- Penangas air tertutup dengan sistem sirkulasi, $45,5^\circ\text{C} \pm 0,2^\circ\text{C}$.

B.9.3.3 Perbenihan pengencer dan pereaksi

- a) *Lauryl sulfate tryptose (LST) broth / Lauryl tryptose (LST) broth*;
- b) *Brilliant green lactose bile (BGLB) broth 2 %*;
- c) *E. C. broth*;
- d) *Levine's eosin methylene blue (L-EMB) agar*;
- e) *Plate count agar (PCA)*;
- f) *gram stain*;
- g) *Tryptone (tryptophane) broth*;
- h) *Pereaksi kovacs'*;
- i) *MR - VP broth*;

- j) Pereaksi *voges proskauer*;
- k) Larutan *methyl red*;
- l) *Koser's citrate medium*;
- m) *Peptone water*;
- n) Pereaksi *indole*;
- o) Larutan kalium hidroksida 40 %;
- p) *Buffer fields phosfat buffered dilution water* (BPBDW).

B.9.3.4 Cara kerja

B.9.3.4.1 *Presumptive test* untuk bakteri *coliform* (uji dugaan)

B.9.3.4.1.1 Persiapan contoh uji

- a) Lakukan persiapan dan homogenisasi contoh seperti pada B.9.1.4.
- b) Inokulasikan masing-masing 1 ml larutan dari setiap tingkat penegenceran (10^{-1} , 10^{-2} dan 10^{-3}) ke dalam tiga tabung *Laurryl sulfate broth*. Pegang pipet sedemikian sehingga ujung bawah pipet menempel pada tabung. Biarkan isi pipet mengalir 2 detik - 3 detik. Pipet jangan ditiup untuk mengeluarkan isinya;
- c) Masukkan tabung-tabung tersebut ke dalam inkubator pada suhu 35°C selama $48 \text{ jam} \pm 2 \text{ jam}$;
- d) Amati tabung-tabung tersebut pada pada jam ke- 24 ± 2 jika ada tabung yang telah mengandung gas, maka tabung tersebut dinyatakan "positif";
- e) Tabung-tabung yang belum mengandung gas dinyatakan "negatif", lanjutkan inkubasi selama 24 jam;
- f) Catat adanya pembentukan gas dalam jumlah berapapun, setelah inkubasi $48 \text{ jam} \pm 2 \text{ jam}$, karena ini adalah *presumptive test* yang positif untuk bakteri *coliform* untuk tabung-tabung yang negatif;
- g) Lakukan *confirmed test* terhadap semua tabung yang positif untuk *presumptive test*.

B.9.3.4.2 *Confirmed Test* untuk bakteri *coliform* (uji penegasan)

- a) Kocok Tabung LST yang positif secara hati-hati dengan cara memutar-mutar tabung;
- b) Pindahkan satu mata Ose dari setiap tabung LST yang positif ke dalam tabung BGLB 2 % yang berlainan;
- c) Masukkan tabung-tabung BGLB 2 % kedalam inkubator pada suhu $35^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ selama $48 \text{ jam} \pm 2 \text{ jam}$;
- d) Catat semua tabung BGLB yang positif menghasilkan gas dan dengan menggunakan tabel Angka Paling Mungkin (APM) Tabel 3., tentukan APM berdasarkan jumlah tabung BGLB yang memperlihatkan pembentukan gas dalam jumlah berapapun, selama $48 \text{ jam} \pm 2 \text{ jam}$ pada $35^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$;
- e) Laporkan sebagai APM bakteri *coliform* per gram.

B.9.3.4.3 *Confirmed Test* untuk *Escherichia coli*

- a) Kocok Tabung LST yang positif secara hati-hati dengan cara memutar-mutar tabung;
- b) Pindahkan satu mata Ose dari setiap tabung LST yang positif ke dalam tabung EC broth yang berlainan;
- c) Inkubasikan tabung-tabung EC tersebut ke dalam penangas air yang bersirkulasi, selama $48 \text{ jam} \pm 2 \text{ jam}$ pada $45,5^{\circ}\text{C} \pm 0,2^{\circ}\text{C}$. Penangas air dipertahankan supaya tetap bersih, tertutup dan dengan tinggi permukaan air di atas permukaan tertinggi media dalam tabung.;
- d) Periksa tabung EC tersebut pada jam ke- 48 ± 2 jika telah terbentuk gas dalam jumlah berapapun maka tabung tersebut dinyatakan "positif";

- e) Kocok tabung-tabung EC yang positif secara hati-hati;
 - f) Digoreskan/ditanamkan pada satu cawan agar L-EMB, sedemikian rupa hingga dihasilkan koloni yang terpisah-pisah dengan jarak minimum 0,5 cm
 - g) Inkubasikan pinggan L - EMB tersebut selama 18 jam -24 jam pada $35^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$;
 - h) Periksa pinggan - pinggan terhadap adanya koloni yang berwarna coklat dengan atau tanpa kilat logam;
 - i) Dari tiap pinggan L - EMB, ambil dengan jarum, paling sedikit 2 koloni yang mencurigakan yang letaknya terpisah dan pindahkan pada tabung agar miring PCA untuk digunakan sebagai inokulum pada uji biokimia;
 - j) Tabung-tabung agar miring dari koloni yang dicurigai ini diinkubasikan selama 18 jam – 24 jam pada 35°C . Buatlah pewarnaan Gram dari tiap biakan, *E coli* adalah Gram negatif dan berbentuk batang tak berspora;
 - k) Uji sifat - sifat biokimia dengan menggunakan reaksi-reaksi IMVIC;
- Pembentukan indol
 - Inokulasi tabung *tryptone broth*.
 - Inkubasi selama 24 jam \pm 2 jam pada 35°C .
 - Uji adanya indol dengan menambahkan 0,2 ml - 0,3 ml pereaksi Kovacs'.
 - Uji ini positif bila lapisan atas berwarna merah.
 - Reaksi *Voges Proskauer* dan *Methyl red*
 - Inokulasi tabung medium MR - VP dari setiap tabung PCA dan inkubasikan selama 48 jam \pm 2 jam pada 35°C .
 - Secara aseptis pindahkan 1 ml biakan tabung reaksi steril.
 - Tambahkan 0,6 ml larutan 5 % alfa naftol dalam alkohol, 0,2 ml larutan KOH 40 % dan beberapa butir kristal kreatin.
 - Uji *Voges Proskauer* adalah positif bila terbentuk warna eosin merah muda dalam waktu 2 jam.
 - Tabung medium MR - VP yang semula, diinkubasikan kembali selama 48 jam pada 35°C .
 - Tambahkan 5 tetes indikator *methyl red* pada setiap tabung.
 - Biakan dianggap MR positif bila terjadi warna merah, MR negatif bila kuning.
 - Penggunaan Sitrat
 - Dengan hati - hati tabung *Koser's citrate medium* diinokulasi dengan menggunakan jarum lurus sedemikian rupa sehingga hanya mengenai permukaan medium. Terlalu banyak inokulasi dapat menyebabkan terbawanya zat - zat lain.
 - Inkubasikan selama 96 jam pada suhu 35°C
 - Adanya pertumbuhan dalam tabung menandakan uji yang positif (perubahan warna dari hijau ke biru).
 - Pembentukan gas dari *Lactose*
 - Inokulasikan tabung kaldu LST dari setiap agar miring PCA. Inkubasikan selama 48 jam \pm 2 jam pada suhu 35°C .
 - Periksa tabung tabung itu terhadap adanya pembentukan gas.

B.9.3.4.4 Klasifikasi dan laporan

Tabel B.2 - Reaksi biokimia *E. coli* pada uji IMVIC

Jasad	Indol	<i>Methyl Red</i>	<i>Voges Proskauer</i>	Citrate
<i>Escherichia Coli</i>				
Varitas I	+	+	-	-
Varitas II	-	+	-	-

- Klasifikasikan sebagai *E. coli* apabila IMVIC adalah + + - - atau - + - -, pewarnaan gram menunjukkan gram negatif bentuk batang tidak bersepora atau *coccus* yang membentuk Gas dalam kaldu LST dengan waktu inkubasi 48 jam \pm 2 jam pada suhu 35 °C
- Hitunglah APM *E. coli* dengan menggunakan Tabel APM berdasarkan jumlah tabung - tabung dari 3 seri pengenceran yang telah dipastikan mengandung *E. coli*.

Tabel B.3 - APM per 1 g contoh bila menggunakan 3 tabung untuk setiap tingkat pengenceran 0,1; 0,01; dan 0,001 g contoh

Tabung yang positif			APM	Tabung yang positif			APM
0,1	0,01	0,001		0,1	0,01	0,001	
0	0	0	<3	2	2	0	21
0	0	1	3	2	2	1	28
0	1	0	3	2	2	2	35
0	1	1	6	2	3	0	29
0	2	0	6	2	3	1	36
0	3	0	9	3	0	0	23
1	0	0	4	3	0	1	39
1	0	1	7	3	0	2	64
1	0	2	11	3	1	0	43
1	1	0	7	3	1	1	75
1	1	1	11	3	1	2	120
1	2	0	11	3	1	3	160
1	2	1	15	3	2	0	93
1	3	0	16	3	2	1	150
2	0	0	10	3	2	2	216
2	0	1	14	3	2	3	290
2	0	2	20	3	3	0	240
2	1	0	15	3	3	1	460
2	1	1	20	3	3	2	1100
2	1	2	27	3	3	3	>1100

B.9.4 *Staphylococcus aureus* (metode plate count)

B.9.4.1 Prinsip

Pertumbuhan bakteri *staphylococcus aureus* pada pembenihan khusus setelah diinkubasi pada suhu 37 °C selama 24 jam – 48 jam dan dilanjutkan dengan uji koagulase

B.9.4.2 Peralatan

- Spreader* dari gelas;
- Botol pengencer 500 ml;
- Tabung reaksi ;
- Gelas ukur 1ml dan 10 ml;
- Cawan petri diameter 90 mm – 100 mm dan 140 mm – 150 mm;
- Gelas sediaan;
- Inkubator 35 °C ;
- Oven;
- Pipet ukur .

B.9.4.3 Perbenihan dan pereaksi

- a) *Baird-parker* agar;
- b) *Brain heart infusion broth* (BHIB);
- c) Plasma kelinci.

B.9.4.4 Cara kerja

- a) Lakukan persiapan dan homogenisasi contoh seperti pada B.9.1.4.
- b) Pipet 0,1 ml suspensi dari setiap pengenceran ke atas permukaan *baird-parker* agar dan sebarkan merata dengan menggunakan *spreader*. Keringkan permukaan agar sebelum diinkubasi.
- c) Inkubasikan pada suhu 35 °C selama 45 jam – 48 jam.
- d) Pilih cawan petri yang mengandung 20 koloni sampai 200 koloni dan hitung tersangka koloni *Staphylococcus aureus* yaitu koloni berwarna abu-abu sampai hitam mengkilat dengan lingkaran cerah disekelilingnya.

B.9.4.5 Uji koagulase

- a) Pindahkan koloni tersangka ke dalam tabung berisi 0,2 ml – 0,3 ml *Brain Heart Infusion Broth* (BHIB).
- b) Inkubasikan pada suhu 35 °C selama 18 jam – 24 jam.
- c) Tambahkan koagulasi plasma kelinci sebanyak 0,5 ml ke dalam kultur BHIB dan campur.
- d) Inkubasikan campuran plasma kelinci dengan biakan BHIB pada 36 °C ± 1 °C selama 6 jam.
- e) Amati ada tidaknya koagulasi. Bila tidak terjadi koagulasi lanjutkan inkubasi pada suhu kamar selama 24 jam, dan amati kembali ada tidaknya koagulasi.
- f) Hitung jumlah *Staphylococcus aureus* dalam 1 g atau 1 ml contoh.

B.9.4.6 Perhitungan

Angka *Staphylococcus aureus* (koloni/g) = $n \times F \times 10$

dengan:

n adalah jumlah koloni, (koloni/g);

F adalah faktor pengenceran dari rata-rata koloni yang dipakai.

B.9.5 Salmonella**B.9.5.1 Prinsip**

Contoh yang diuji ditumbuhkan terlebih dahulu pada media pengkayaan dan kemudian ditumbuhkan pada media selektif. Selanjutnya contoh dideteksi dengan menumbuhkannya pada media agar selektif. Koloni-koloni yang diduga *Salmonella* pada media selektif kemudian diisolasi dan dilanjutkan dengan konfirmasi melalui uji biokimia dan uji serologi untuk meyakinkan ada atau tidaknya bakteri *Salmonella*.

B.9.5.2 Peralatan

- Neraca analitik terkalibrasi dengan ketelitian 0,1 g;
- Kertas pH;
- Pipet 10ml;
- Pipet tetes;
- Botol pengencer 1000 ml;

- Tabung reaksi;
- Gelas ukur 10 ml, dan 100 ml;
- Cawan petri 90 mm -100 mm dan 140 mm -150 mm;
- Gelas sediaan;
- Inkubator 35 °C;
- Oven;
- Penangas air;
- Pengaduk gelas;
- Sengkelit (ose)/jarum inokulasi;
- Pensil lilin;
- Bunsen;
- Autoklaf;

B.9.5.3 Perbenihan dan pereaksi

- a) *Selenite cystine broth*;
- b) *Tetrathionate broth* (dengan *iodine* dan *brilliant broth*);
- c) *Xylose lysine desoxycholate broth* (XLD);
- d) *Hektoen enteric agar* (HE);
- e) *Bismuth sulfite agar* (BSA);
- f) *Triple sugar iron agar* (TSI);
- g) *Buffered glucose broth* (MR-VP medium);
- h) Urea agar;
- i) *Lactose broth*;
- j) *Lysin iron agar* (LIA);
- k) Pereaksi indol dan perbenihan indol;
- l) *Lysin dextrarboxylation medium* (LDC);
- m) Nutrien agar;
- n) Pereaksi kovacs ;
- o) *Polyvalent somatic (o) test*;
- p) *Polyvalent flagellar (h) test*;
- q) HCl;
- r) NaOH;
- s) Larutan *physiological saline* 0,85%;
- t) Larutan *potassium hydroxide* 40%;
- u) Larutan *formalized physiological saline*;
- v) *Rapid urea broth*;
- w) *Mac Conkey agar*;
- x) *Simmon citrate agar*;
- y) *Tryptone broth*.

B.9.5.4 Cara Kerja

B.9.5.4.1 Homogenisasi contoh dan pra-pengkayaan

- a) Timbang 25 g contoh ke dalam botol pengencer 500 ml dan tambahkan 225 ml *lactose broth*. Kocok hingga tercampur merata;
- b) Biarkan pada suhu ruang selama 60 menit dengan wadah tertutup. Kocok perlahan dan atur pH sampai $6,8 \pm 0,2$;
- c) Kendurkan tutup wadah secukupnya / $\frac{1}{4}$ putaran. Inkubasikan selama 24 jam \pm 2 jam pada 35 °C

B.9.5.4.2 Pengkayaan (*enrichment*)

- Kencangkan tutup wadah dan kocok secara perlahan contoh yang telah selesai diinkubasi;
- Pipet 10 ml biakan pra-pengkayaan kedalam 100 ml *selenite cystine broth* atau pipet 10 ml biakan pra-pengkayaan ke dalam 100 ml *tetrathionate broth*
- Inkubasikan pada suhu 35 °C selama 24 jam ± 2 jam.

B.9.5.4.3 Penanaman pada pembenihan pilihan / selektif

- Kocok contoh yang telah diinkubasi dan dengan menggunakan jarum ose, goreskan sepanjang 3 mm biakan pengkayaan TTB ke dalam cawan petri yang berisi media XLD, HE dan BS agar. Siapkan BS agar sehari sebelum digunakan dan simpan ditempat gelap pada suhu ruang sampai siap digores.
- Ulangi cara di atas dari media pengkayaan SCB;
- Inkubasikan cawan-cawan BSA, HE dan XLD selama 24 jam pada suhu 35 °C;
- Amati kemungkinan adanya koloni *Salmonella*.

Morfologi koloni mempunyai ciri-ciri sebagai berikut:

Ambil 2 atau lebih koloni *Salmonella* dari masing-masing media agar selektif setelah 24 jam ± 2 jam inkubasi. Koloni-koloni *Salmonella* adalah sebagai berikut:

XLD:koloni berwarna merah jambu (pink) dengan atau tanpa inti hitam. Kebanyakan *Salmonella* membentuk koloni besar, inti hitam mengkilap atau mungkin nampak hampir semuanya berwarna hitam. Beberapa kultur *Salmonella* memproduksi koloni kuning dengan atau tanpa inti hitam pada media XLD dan HE.

HE:koloni berwarna hijau kebiruan sampai biru dengan atau tanpa inti hitam. Kebanyakan *Salmonella* membentuk koloni besar, inti hitam mengkilat atau mungkin nampak hampir semuanya berwarna hitam.

BS :koloni berwarna coklat, abu-abu sampai hitam dan kadang-kadang kilap logam. Jika masa inkubasi bertambah maka warna media disekitar koloni mula-mula coklat kemudian menjadi hitam. Pada beberapa strain koloni berwarna hijau dengan atau tanpa warna gelap disekitar media.

- Jika tidak ada koloni yang khas atau koloni tersangka pada media BSA setelah inkubasi 24 jam ± 2 jam, jangan mengambil koloni tapi inkubasi kembali media selama 24 jam ± 2 jam. Jika tidak ada koloni yang khas atau koloni tersangka pada media BSA setelah inkubasi 48 jam ± 2 jam, ambil 2 atau lebih koloni yang tidak khas
- Dengan menggunakan jarum inokulasi steril, ambil secara hati-hati bagian tengah koloni dan inokulasikan kedalam media TSI agar miring dengan cara menggores agar miring dan menusuk agar tegak. Tanpa mengambil koloni baru, gunakan jarum yang sama untuk menginokulasikan media LIA dengan cara menusuk agar tegak lebih dahulu, setelah itu goreskan pada agar miring. Karena *reaksi Lysine decarboxylase* sangat anaerobik, LIA miring harus mempunyai tusukan yang dalam (4 cm). Simpan media agar selektif yang telah diambil koloni pada suhu 5 °C ± 8 °C.
- Inkubasi TSI dan LIA pada suhu 35 °C selama 24 jam ± 2 jam dengan membiarkan tutup sedikit kendur untuk mencegah terbentuknya H₂S yang berlebihan. Pada TSI, kultur *Salmonella* yang khas memberikan reaksi alkalin (merah) pada goresan dan asam (kuning) pada tusukan, dengan atau tanpa H₂S (warna kehitaman pada agar). Pada LIA kultur *Salmonella* yang khas memberikan reaksi alkalin (ungu) pada keseluruhan tabung. Reaksi yang benar-benar kuning pada tusukan dinyatakan sebagai kultur negatif. Jangan hanya melihat perubahan warna pada tusukan untuk menyatakan kultur negatif. Umumnya kultur *Salmonella* membentuk H₂S pada agar miring LIA. Beberapa kultur non *Salmonella* membentuk reaksi merah bata pada agar kiring LIA.

- h) Semua biakan yang memberikan reaksi alkalin pada bagian tusukan didalam media LIA tanpa memperhatikan reaksi TSI akan potensial sebagai *Salmonella* dan dilakukan uji biokimia dan serologi. Kultur yang memberikan reaksi asam pada tusukan pada media LIA dan alkalin pada goresannya dan reaksi asam pada tusukan di TSI harus dipertimbangkan juga sebagai potensial *Salmonella* dan harus dilakukan uji biokimia dan serologi. Kultur yang memberikan reaksi asam pada tusukan di media LIA dan asam pada goresannya, dan reaksi asam pada tusukannya di media TSI dapat dinyatakan sebagai bukan *Salmonella*. Bila kultur TSI tidak menunjukkan reaksi khas *Salmonella* (alkalin pada goresan dan asam pada tusukan), ulangi lagi pengujian dengan mengambil koloni yang mencurigakan dari medium selektif yang tidak memberikan kultur duga positif dan inokulasi dengan menggores media TSI dan LIA seperti cara mulai no. f di atas.
- i) Lakukan uji identifikasi biokimia dan serologi terhadap:
- Tiga kultur presumtif TSI dari 1 set media selektif (HE, XLD dan BSA) yang diinokulasi dari TTB, SCB ;
 - Jika tiga kultur presumtif positif TSI tidak terisolasi dari 1 set media selektif, uji presumtif positif TSI dari media agar yang lain. Uji sedikitnya 6 kultur TSI untuk setiap 25 g contoh makanan.

B.9.5.5 Identifikasi *Salmonella*

B.9.5.5.1 Kultur campuran

Apabila kultur TSI agar terlihat tercampur, maka goreskan kembali kedalam media *MacConkey agar*, HE atau XLD. Inkubasi selama 24 jam \pm 2 jam pada suhu 35 °C. Amati koloni yang diduga *Salmonella* :

- Mac Conkey agar*. Koloni yang khas tampak transparan dan tidak berwarna, kadang-kadang dengan inti hitam. Koloni-koloni *Salmonella* akan membentuk area yang terang akibat pengendapan bakteri lain yang kadang-kadang tumbuh;
- Hektoen Enteric (HE) agar*. Koloni-koloni hijau kebiruan sampai biru dengan atau tanpa inti hitam. Pada umumnya kultur *Salmonella* membentuk koloni besar, inti hitam mengkilat atau hampir seluruh koloni terlihat berwarna hitam;
- Xylose Lysine desoxycholate (XLD) agar*. Koloni merah jambu (*pink*) dengan atau tanpa inti hitam. Pada umumnya kultur *Salmonella* membentuk koloni besar, inti hitam mengkilat atau hampir seluruh koloni terlihat berwarna hitam.

Pindahkan sedikitnya 2 koloni terduga *Salmonella* pada media TSI dan LIA seperti pada butir B.9.5.4.3.f dan lanjutkan seperti pada butir B.9.5.4.3.g

B.9.5.5.2 Kultur Murni

- Uji urease (konvensional)
Inokulasikan dari TSI yang diduga *Salmonella* dengan jarum inokulasi ke dalam Urea agar. Inkubasikan selama 24 jam \pm 2 jam pada suhu 35 °C;
- Uji Urease (cepat)
Inokulasikan dari TSI yang diduga *Salmonella* dengan jarum inokulasi ke dalam *rapid urea Broth*. Inokulasikan 2 jam dalam water bath pada suhu 37 °C \pm 0,5 °C. Reaksi *Salmonella* yang khas untuk uji urease memberikan hasil negatif (tidak terjadi perubahan warna);

B.9.5.5.3 Pengujian kultur urease negatif

a) *Lysine Decarboxylase Broth* (LDB)

Uji ini dilakukan hanya jika reaksi LIA meragukan. Ambil 1 ose dari TSI dan inokulasikan kedalam media LDB. Kendurkan tutupnya dan inkubasi selama 48 jam \pm 2 jam pada suhu 35 °C, tetapi amati setelah 24 jam. *Salmonella* memberikan reaksi alkalin ditandai dengan warna ungu pada seluruh media. Reaksi negatif ditunjukkan dengan warna kuning pada seluruh media. Jika hasil reaksi tidak menunjukkan warna kuning atau ungu tambahkan beberapa tetes 0,2% *bromocresol purple dye* dan amati perubahan warnanya;

b) *Phenol red dulcitol* atau *purple broth base* dengan 0,5% *dulcitol*;

Inokulasi media *dulcitol broth* dari biakan TSI. Kendurkan tutupnya dan inkubasi selama 48 jam \pm 2 jam pada suhu 35 °C, tetapi amati setelah 24 jam. Pada umumnya *Salmonella* memberikan hasil positif, ditandai dengan pembentukan gas dalam tabung durham dan pH asam (kuning) pada media. Reaksi negatif ditandai dengan tidak terbentuknya gas pada tabung durham dan warna merah (*phenol red* sebagai indikator) atau ungu (*bromocresol purple* sebagai indikator) pada seluruh media.

c) *Tryptone (tryptophane) broth* (TB)

Inokulasi media *tryptone broth* dari biakan TSI. Inkubasikan selama 24 jam pada suhu 35°C dan selanjutnya ikuti prosedur di bawah ini :

1. *Potassium Cyanida* (KCN) *broth*

Pindahkan 1 sengkeli biakan dari TB 24 jam kedalam media KCN *broth*. Tutup tabung rapat-rapat dan lapi dengan kertas parafilm. Inkubasikan selama 48 jam \pm 2 jam pada suhu 35 °C tetapi amati setelah 24 jam. Hasil positif ditunjukkan dengan adanya pertumbuhan ditandai dengan adanya kekeruhan). Umumnya *Salmonella* tidak tumbuh pada media ini dengan ditandai dengan tidak terjadinya kekeruhan

2. *Malonate broth*

Pindahkan 1 sengkeli dari biakan TB kedalam media *Malonate broth*. Inkubasikan selama 48 jam sampai 2 jam pada suhu 35 °C, tetapi amati setelah 24 jam. Kadang-kadang tabung *Malonate broth* yang tidak diinokulasi berubah menjadi biru. Oleh karena itu gunakan *Malonate broth* sebagai kontrol. Reaksi positif ditandai dengan perubahan warna menjadi biru. Umumnya *Salmonella* memberikan reaksi negatif (hijau atau tidak ada perubahan warna) pada broth ini.

3. Uji indol

Dari media TB yang tersisa, tambahkan 0,2 ml sampai 0,3 ml pereaksi kovacs. Amati segera setelah penambahan reagen. Reaksi positif ditandai dengan terbentuknya cincin merah pada permukaan media. Umumnya *Salmonella* memberikan reaksi negatif (tidak terbentuk cincin merah pada permukaan media). Reaksi yang warnanya berada antara jingga dan merah muda dinyatakan sebagai +

Nyatakan kultur sebagai bukan *Salmonella* bila reaksi indol positif dan *flagellar* (H) negatif, atau KCN positif dan LDB negatif;

B.9.5.5.4 Uji serologi polyvalent flagellar (H)

a) Inokulasi dari masing-masing TSI agar yang memberikan reaksi urease negatif kedalam:

1) *BHI broth*, dan inkubasi selama 4 jam sampai 6 jam pada suhu 35 °C sampai terlihat pertumbuhan (untuk diuji pada hari yang sama) atau

2) *Trypticase Soy Trypticase broth* (TSTB) dan inkubasi selama 24 jam \pm 2 jam pada suhu 35 °C (untuk diuji hari berikutnya). Tambahkan 2,5 ml larutan *formanilized physiological saline* ke dalam 5 ml kultur di atas;

b) Siapkan 2 kultur dari TSI (contoh dan kontrol) yang telah diberi *formanilized physiological saline* dan uji dengan *Salmonella polyvalent flagellar* (H) antisera. Masukkan \pm 0,5 ml larutan *saline Salmonella polyvalent flagellar* (H) antisera dalam tabung serologi 10 mm x 75 mm atau 13 mm x 100 mm. Tambahkan 0,5 ml antigen yang akan diuji. Siapkan kontrol *saline* dengan mencampur 0,5 ml *formanilized physiological saline*

dengan 0,5 ml *formanilized* antigen. Inkubasikan campuran tersebut dalam penangas air pada suhu 48 °C sampai 50 °C. Amati setiap interval waktu 15 menit dan amati hasilnya dalam 1 jam.

Positif apabila terjadi penggumpalan dalam uji campuran dan tidak ada penggumpalan dalam kontrol

Negatif apabila tidak ada penggumpalan dalam uji campuran dan tidak ada penggumpalan dalam kontrol

Non spesifik terjadi penggumpalan dalam uji campuran dan kontrol

B.9.5.5.5 Uji serologi *polyvalent somatic* (o)

- a) Dengan menggunakan pensil lilin, buat garis empat persegi-panjang berukuran 1 cm x 2 cm di atas kaca atau cawan petri plastik berukuran 15 mm x 100 mm atau di atas gelas sediaan;
- b) Emulsikan biakan dari TSI miring umur 24 jam sampai 48 jam dengan 2 ml 0,85% *saline* menggunakan ose (dapat juga menggunakan biakan dari *tryptose blood agar base* tanpa darah);
- c) Tambahkan 1 tetes suspensi biakan di atas masing-masing bagian empat-persegi panjang yang telah diberi tanda dengan pensil lilin;
- d) Tambahkan 1 tetes larutan *saline* pada bagian pertama dan tambahkan 1 tetes polivalen somatic (o) antiserum ke dalam bagian yang lain;
- e) Campurkan atau homogenkan bagian atas menggunakan ose yang bersih dan steril selama 1 menit ;
- f) Klasifikasi tes *polyvalent somatic* (o) menunjukkan hasil sebagai berikut : Positif : terjadi penggumpalan didalam pencampuran tes, pada kontrol salin tidak terjadi penggumpalan; Negatif : tidak terjadi penggumpalan di dalam pencampuran tes, pada kontrol salin tidak terjadi penggumpalan
Tidak spesifik : terjadi penggumpalan didalam pencampuran tes dan pada kontrol salin

B.9.5.5.6 Uji biokimia tambahan

Nyatakan sebagai *Salmonella*, kultur yang memberikan reaksi yang khas seperti pada tabel 4 butir 1 -11. Jika 1 kultur TSI dari setiap 25 g contoh menunjukkan *Salmonella*, uji biokimia tambahan tidak diperlukan. Kultur yang memberikan reaksi positif pada uji serologi *flagellar* (H) tapi tidak menunjukkan karakteristik *Salmonella* pada uji biokimia, harus dimurnikan seperti pada butir B.9.5.5.1 diatas dan uji kembali pada butir B.9.5.5.2

Lakukan uji tambahan berikut ini terhadap kultur yang tidak memberikan reaksi yang khas seperti Tabel 2 :

- a) *Phenol red lactose* atau *purple lactose broth*

Inokulasi broth ini dengan kultur TSI agar miring yang telah diinkubasi selama 24 jam sampai 48 jam. Inkubasi selama 48 jam ± 2 jam pada suhu 35 °C, tetapi amati setelah 24 jam;

Positif, apabila terjadi pembentukan asam (kuning) dan gas pada tabung durham. Apabila hanya terjadi pembentukan asam, maka dapat dinyatakan positif. Umumnya *Salmonella* memberikan hasil negatif, ditunjukkan dengan tidak terbentuknya gas pada tabung durham dan warna merah (*phenol red* sebagai indikator) atau ungu (*bromocresol purple* sebagai indikator) pada seluruh media.

Nyatakan sebagai bukan *Salmonella* jika kultur memberikan reaksi lactose positif, kecuali kultur yang memberikan reaksi asam pada agar miring TSI dan reaksi alkalin pada LIA atau reaksi positif pada *malonate broth*;

b) *Phenol red sucrose* atau *purple sucrose broth*

Ikuti prosedur seperti pada B.7.5.5.6.a nyatakan sebagai bukan *Salmonella* pada kultur yang memberikan reaksi positif, kecuali kultur yang memberikan reaksi asam pada agar miring TSI dan reaksi positif (alkalin) pada LIA;

c) *Methyl Red-Voges-Proskauer* (MR-VP) *broth*

Inokulasi medium dengan sedikit biakan TSI agar miring dan inkubasikan selama 48 jam \pm 2 jam pada suhu 35 °C;

Lakukan uji Voges-Proskauer (VP) pada suhu ruang sebagai berikut :

Pindahkan 1 ml *MR-VP broth* yang telah diinkubasi selama 48 jam \pm 2 jam kedalam tabung reaksi steril dan inkubasikan kembali *MR-VP broth* selama 48 jam \pm 2 jam pada suhu 35 °C. Tambahkan 0,6 ml *alpha naftol* dan aduk. Tambahkan 0,2 ml larutan KOH 40% dan aduk kembali. Untuk mempercepat reaksi tambahkan sedikit kristal kreatin dan amati hasilnya setelah 4 jam. Perubahan warna menjadi merah bata sampai merah delima pada media menunjukkan reaksi positif. Umumnya *Salmonella* memberikan reaksi VP negatif;

Uji merah metil (MR)

Tambahkan 5 tetes indikator merah metil kedalam media MR-VP yang telah diinkubasi selama 96 jam. Amati hasilnya dengan segera. Umumnya *Salmonella* memberikan reaksi positif, ditandai dengan terjadinya difusi warna merah pada media. Terjadinya wana kuning menunjukkan reaksi negatif;

Nyatakan sebagai bukan *Salmonella* kultur yang memberikan reaksi KCN dan VP positif serta MR negatif

d) *Simmons citrate* agar

Inokulasi medium dengan menggunakan jarum yang mengandung biakan dari TSI agar miring, dengan cara menggores agar miring dan menusuk agar tegak. Inkubasikan selama 96 jam \pm 2 jam pada suhu 35 °C;

Positif, apabila terjadi pertumbuhan yang biasanya diikuti dengan perubahan warna dari hijau menjadi biru. Umumnya *Salmonella* memberikan hasil sitrat positif

Negatif, apabila tidak ada atau sedikit sekali pertumbuhan dan tidak terjadi perubahan warna

B.9.5.5.7 Pernyataan hasil

Laporkan sebagai *Salmonella* kultur-kultur yang mempunyai reaksi seperti pada Tabel B.4. Laporkan sebagai bukan *Salmonella* kultur-kultur yang memberikan reaksi seperti pada Tabel B.5. Bila tidak ada 1 kultur TSI yang menunjukkan reaksi *salmonella* pada uji biokimia, lakukan uji biokimia mulai dari butir B.9.5.5.3 terhadap kultur yang memberikan reaksi urease negatif dari contoh yang sama.

Tabel B.4 - Reaksi biokimia dan serologi untuk *Salmonella*

No.	Test Subrat	Hasil Reaksi Positif	Negatif	<i>Salmonella</i> Reaksi species ^a
1.	<i>Glucose</i>	Tusukan kuning	Tusukan merah	+
2.	<i>Lysine Decarboxylase</i> (LIA)	Tusukan ungu	Tusukan kuning	+
3.	H ₂ S (TSI dan LIA)	Hitam	Tidak hitam	+

Tabel B.4 (lanjutan)

No.	Test Subrat	Hasil Reaksi Positif	Negatif	<i>Salmonella</i> Reaksi speciesa
4.	<i>Urease</i>	Warna ungu sampai merah	-	-
5.	<i>Lysine Decarboxy Broth</i>	Warna ungu	Warna kuning	+
6.	<i>Phenol Red Dulcitol Broth</i>	Warna kuning dengan/ gas	Tanpa/ tidak berbentuk gas, tidak berubah warna	+ ^b
7	<i>KCN broth</i>	Pertumbuhan	Tidak ada pertumbuhan	-
8	<i>Malonate broth</i>	Warna biru	Tidak berubah warna	- ^c
9	<i>Indol test</i>	Permukaan warna merah	Permukaan warna kuning	-
10	<i>Polyvalent flagellar test</i>	aglutinasi	Tidak aglutinasi	+
11	<i>Polyvalent somatic test</i>	Aglutinasi	Tidak aglutinase	+
12	<i>Phenol red lactose broth</i>	Warna kuning dengan/tanpa gas	Tidak berbentuk gas dan tidak berubah warna	- ^c
13	<i>Phenol red sucrose broth</i>	Warna kuning dengan/tanpa gas	Tidak berbentuk gas dan tidak berubah warna	-
14	<i>Voges-prokquer test</i>	Ungu sampai merah	Tidak berubah warna	-
15	<i>Methil red test</i>	Merah menyebar	Kuning menyebar	+
16	<i>Simmons Citrate</i>	Pertumbuhan, warna biru	Tidak ada pertumbuhan dan perubahan	V
CATATAN : ^a + : 90% atau lebih positif dalam satu atau dua hari - : 90% atau lebih positif dalam satu atau dua hari V : Variabel ^b : Mayoritas dari kultur Arizona: negatif ^c : Mayoritas dari kultur Arizona: positif				

Tabel B.5 - Reaksi biokimia dan serologi untuk non *Salmonella*

No	Test Substrat	Hasil
1	<i>Urease</i>	Positif (warna ungu-merah)
2	<i>Test indol dan test polivalen flagellar (H)</i>	Negatif (tidak ada penggumpalan)
3	<i>Lysine decarboxylase dan KCN broth</i>	Negatif (ada pertumbuhan) Positif (warna kuning)

Tabel B.5 (lanjutan)

No	Test Substrat	Hasil
4	<i>Phenol red lactose broth</i>	Positif (warna kuning ada/tidak ada gas) ^{a,b}
5	<i>Phenol red sucrose broth</i>	Positif (warna kuning ada/tidak ada gas) ^b
6	<i>Voges-proquer test methyl red test</i>	Positif (warna pink sampai merah) Negatif (warna kuning menyebar)

CATATAN:
^a test *malonate broth* positif lebih lanjut untuk mengamati jika biakan tersebut *Salmonella arizonae*
^b jangan dibuang biakan positif jika biakan LIA menunjukkan reaksi bercirikan *Salmonella*, uji lebih lanjut untuk mengamati apakah spesies tersebut *Salmonella*

B.9.6 Kapang / khamir

B.9.6.1 Prinsip

Pertumbuhan kapang/khamir dalam media yang sesuai, setelah diinkubasikan pada suhu 25 °C ± 1°C selama 5 hari.

B.9.6.2 Pembenihan dan pengencer

- Peptone dilution fluid* atau *pepton water*;
- PDA (*potato dextrose agar*) atau pembenihan yang lainnya (*Mycophil*, *Malt extract agar*) yang ditambahkan dengan antibiotik klorotetrasiklin atau kloramfenikol atau streptomisin. Tambahkan 1 ml larutan antibiotik atau 1 gram antibiotik ke dalam 250 ml pembenihan dan aduk kemudian tuangkan ke dalam 100 ml air suling steril;
- PDA (*Potato dextrose agar*).
 - *Infusion from white potatoes* 200 g
 - *Dextrose* 20 g
 - *Agar* 15 g
 - *Air suling* 1000 ml

Larutkan semua bahan. Masukkan dalam labu, sterilkan pada 121 °C selama 15 menit. Sebelum dipergunakan dinginkan sampai 50 °C dan pH diatur 3,5 dengan asam tartrat 10 % steril. Penurunan pH dapat diganti dengan penambahan 4 ml antibiotik (1g/100ml). Campurkan, kemudian tuangkan ke dalam piringan petri.

B.9.6.3 Peralatan

- Cawan petri 100 mm x 15 mm;
- Pipet ukur 1 ml dan 10 ml;
- Penangas air 45 °C ± 1°C;
- Inkubator 25 °C terkalibrasi;
- Alat penghitung koloni;
- Mikroskop.

B.9.6.4 Cara kerja

- Lakukan persiapan dan homogenisasi contoh sesuai B.9.1.4.
- Pipet masing-masing 1 ml dari pengenceran 10¹-10² ke dalam cawan petri steril secara duplo;

- c) Tuangkan 15 ml – 20 ml PDA ke dalam masing-masing cawan petri dalam waktu 15 menit dari pengenceran pertama. Pada saat penuangan PDA masih dalam bentuk cair dengan suhu $45^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$;
- d) Goyang cawan petri dengan hati-hati (putar dengan arah goyang kedepan, ke belakang, ke kanan dan ke kiri) sehingga tercampur merata;
- e) Biarkan hingga campuran dalam cawan petri membeku;
- f) Masukkan semua cawan petri dengan posisi tidak terbalik ke dalam inkubator dan inkubasi pada suhu 25°C selama 5 hari;
- g) Hitung koloni kapang/khamir (perhitungan dapat dilakukan mulai hari ke tiga sampai hari ke lima);
- h) Nyatakan hasil perhitungan sebagai jumlah kapang/khamir per gram contoh;

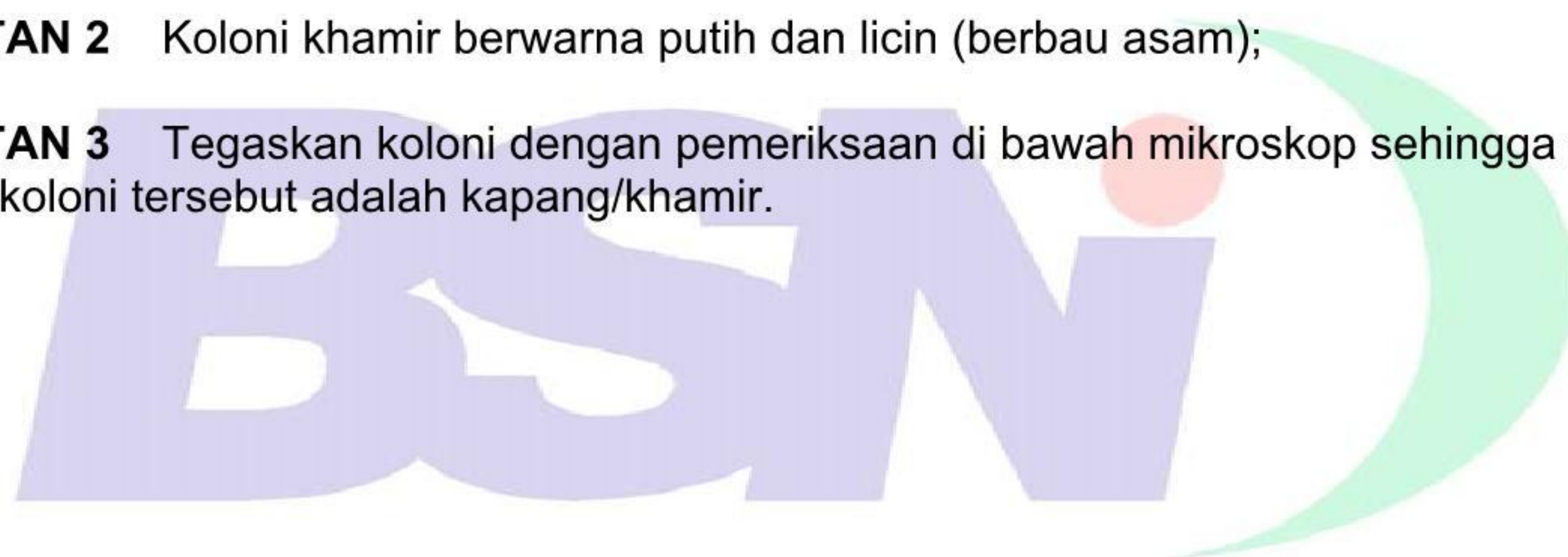
B.9.6.5 Pernyataan hasil

Pilih cawan petri dari satu pengenceran yang menunjukkan jumlah koloni antara 10 koloni – 150 koloni setiap cawan petri. Hitung semua koloni dalam cawan petri dengan menggunakan alat penghitung koloni. Hitung rata-rata jumlah koloni dan kalikan dengan faktor pengenceran. Nyatakan hasilnya sebagai jumlah kapang/khamir per gram.

CATATAN 1 Koloni kapang biasanya buram dan berbulu;

CATATAN 2 Koloni khamir berwarna putih dan licin (berbau asam);

CATATAN 3 Tegaskan koloni dengan pemeriksaan di bawah mikroskop sehingga yakin bahwa koloni tersebut adalah kapang/khamir.



Bibliografi

- Association of Official Analytical Chemistry. 2000. AOAC Official Method 925.49B, Moisture in Confectionery, 17th Edition, Chapter 44.3.01.(penambahan referensi)
- Association of Official Analytical Chemistry. 2000. AOAC Official Method 977.10, Moisture in Cacao Products, 17th Edition, Chapter 31.1.03.
- Association of Official Analytical Chemistry. 2000. AOAC Official Method 925.49C, Ash in Confectionery, 17th Edition, Chapter 44.3.01.
- Egan, H., Kirk, R. S. dan Sawyer R. Pearson's Chemical Analysis of Foods. 1981. Sugar and Preserves. 8th edition. Chapter 6.
- Association of Official Analytical Chemistry. 2000. AOAC Official Method 986.15, Arsenic, Cadmium, Lead, Selenium, and Zinc in Human and Pet Foods, Multielement Method, 17th Edition, Chapter 9.1.01.
- Association of Official Analytical Chemistry. 2000. AOAC Official Method 985.16, Tin in Canned Foods, Atomic Absorption Spectrophotometric Method, 17th Edition, Chapter 9.2.35.
- Association of Official Analytical Chemistry. 2000. AOAC Official Method 971.21, Mercury in Foods, Atomic Absorption Spectrophotometric Method, 17th Edition, Chapter 9.2.22.
- Association of Official Analytical Chemistry. 2000. AOAC Official Method 966.23, Microbiological Methods, 17th Edition, Chapter 17.2.01.
- Association of Official Analytical Chemistry. 2000. AOAC Official Method 967.25, Salmonella in Foods, Preparation of culture media and reagents. 17th Edition, Chapter 17.9.01.
- Food and Drug Administration. Bacteriological Analytical Manual. 1998. Aerobic Plate Count. 8th edition. Chapter 3.
- Food and Drug Administration. Bacteriological Analytical Manual. 1998. Escherichia coli and Coliform Bacteria. 8th edition. Chapter 4.
- Food and Drug Administration. Bacteriological Analytical Manual. 1998. Staphylococcus aureus. 8th edition. Chapter 12.
- Food and Drug Administration. Bacteriological Analytical Manual. 1998. Mold, Yeast and Mycotoxin. 8th edition. Chapter 18.











BADAN STANDARDISASI NASIONAL - BSN
Gedung Manggala Wanabakti Blok IV Lt. 3-4
Jl. Jend. Gatot Subroto, Senayan Jakarta 10270
Telp: 021- 574 7043; Faks: 021- 5747045; e-mail : bsn@bsn.or.id